

Aus der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie

(Prof. Dr. med. G. Burckhardt)

im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss von Transforming Growth Factor - beta 1
(TGF- β 1) und Hypoxie auf die Expression von
Sulfattransportern (SAT-1 und NaS_i-1) in den humanen
renalen Zelllinien TK173 und TK188

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hendrik von Fintel

aus

Celle

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. phil. nat. B.C. Burckhardt

II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. O. Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Inhaltsverzeichnis..... | II |
| Abbildungsverzeichnis..... | V |
| Tabellenverzeichnis..... | VIII |
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Nierenfibrose | 1 |
| 1.2 Extrazellulärmatrix..... | 3 |
| 1.3 Sulfatmetabolismus | 4 |
| 1.4 Die solute-carrier (SLC) - Transporterfamilie..... | 5 |
| 1.4.1 Natriumabhängiger Sulfattransporter - 1 (NaS _i -1, Genname: SLC13A1)..... | 7 |
| 1.4.2 Sulfat-Anionen-Transporter-1 (SAT-1, Genname: SLC26A1) | 9 |
| 1.5 E-Cadherin (E-CDH, CDH1) | 10 |
| 1.6 Alpha-glattes Muskelaktin (α -sma, ACTA2) und Myofibroblasten..... | 11 |
| 1.7 Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1)..... | 12 |
| 1.8 Hypoxie..... | 14 |
| 2 Fragestellung..... | 17 |
| 3 Material..... | 18 |
| 3.1 Oligonucleotidprimer | 18 |
| 3.2 Real-time PCR Assay | 19 |
| 3.3 Antikörper | 19 |
| 3.4 Zellmaterial | 19 |
| 3.5 Medien, Lösungen, Puffer | 20 |
| 3.6 Chemikalien..... | 21 |
| 3.7 Kits und Enzyme | 22 |
| 3.8 Geräte..... | 22 |
| 3.9 Software | 23 |
| 4 Methoden..... | 24 |
| 4.1 Zellkultur | 24 |
| 4.1.1 Kulturmedium (TK-Medium) | 24 |
| 4.1.2 Kultivierung | 24 |
| 4.1.3 Zellernte und Passagieren der Zellen | 24 |
| 4.2 TGF- β 1 | 25 |
| 4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 26 |
| 4.3.1 Prinzip..... | 26 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.3.2 | Isolierung und Aufreinigung der RNS..... | 29 |
| 4.3.3 | Reverse Transkription..... | 30 |
| 4.4 | Quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR)..... | 32 |
| 4.4.1 | Prinzip..... | 32 |
| 4.4.2 | Durchführung..... | 33 |
| 4.5 | Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 34 |
| 4.6 | Hypoxie..... | 34 |
| 4.7 | Isolierung der Zellmembranproteine..... | 35 |
| 4.8 | Proteinbestimmung nach Bradford..... | 35 |
| 4.9 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 36 |
| 4.10 | Western Blot..... | 37 |
| 4.10.1 | Proteintransfer auf die PVDF – Membran..... | 37 |
| 4.10.2 | Proteinnachweis auf den Western Blots..... | 37 |
| 4.11 | Transport von [³⁵ S]Sulfat..... | 38 |
| 4.12 | Statistik..... | 39 |
| 5 | Ergebnisse..... | 40 |
| 5.1 | Zellwachstum und -form..... | 40 |
| 5.2 | Nachweis von spezifischer mRNA in den Zelllinien TK173 und TK188..... | 40 |
| 5.2.1 | Nachweis von SAT-1-mRNA..... | 41 |
| 5.2.2 | Nachweis von NaS _i -1-mRNA..... | 41 |
| 5.2.3 | Nachweis von E-Cadherin-mRNA..... | 42 |
| 5.2.4 | Nachweis von alpha-glattes-Gefäßmuskelaktin-mRNA..... | 42 |
| 5.3 | Einfluss von TGF-β1 auf die Zelllinien TK173 und TK188..... | 43 |
| 5.3.1 | Einfluss von TGF-β1 auf das Zellwachstum..... | 43 |
| 5.3.2 | Einfluss von TGF-β1 auf die SAT-1-mRNA-Expression..... | 45 |
| 5.3.3 | Einfluss von TGF-β1 auf die NaS _i -1-mRNA-Expression..... | 48 |
| 5.3.4 | Einfluss von TGF-β1 auf den mRNA-Gehalt von alpha-glattes Gefäßmuskelaktin..... | 51 |
| 5.3.5 | Einfluss von TGF-β1 auf den E-Cadherin-mRNA-Gehalt..... | 54 |
| 5.4 | Einfluss von Hypoxie auf die Zelllinien TK173 und TK188..... | 56 |
| 5.4.1 | Einfluss von Hypoxie auf den SAT-1-mRNA-Gehalt..... | 57 |
| 5.4.2 | Einfluss von Hypoxie auf den NaS _i -1-mRNA-Gehalt..... | 60 |
| 5.4.3 | Einfluss von Hypoxie auf den alpha-glattes-Gefäßmuskelaktin-mRNA-Gehalt..... | 63 |
| 5.4.4 | Einfluss von Hypoxie auf den E-Cadherin-mRNA-Gehalt..... | 66 |
| 5.5 | Einfluss von Hypoxie auf die SAT-1 - Protein - Expression..... | 69 |
| 5.6 | Einfluss von Hypoxie auf die [³⁵ S]Sulfataufnahme..... | 69 |
| 6 | Diskussion..... | 72 |

| | | |
|-----|---|----|
| 6.1 | Nachweis der spezifischen mRNS von SAT-1, NaS _f -1, E-CDH und α -sma in den Zelllinien TK173 und TK188..... | 72 |
| 6.2 | Einfluss von TGF- β 1 auf die Zellmorphologie sowie die mRNS-Mengen von SAT-1 und NaS _f -1 | 73 |
| 6.3 | Einfluss von TGF- β 1 auf die mRNS-Mengen von α -sma und E-Cadherin | 75 |
| 6.4 | Einfluss von Hypoxie auf die mRNS-Mengen von SAT-1 und NaS _f -1 | 77 |
| 6.5 | Einfluss von Hypoxie auf die mRNS-Mengen von α -sma und E-Cadherin..... | 78 |
| 6.6 | Einfluss von Hypoxie auf die Proteinmenge von SAT-1 und die [³⁵ S]Sulfataufnahme | 80 |
| 6.7 | Ausblick und Schlussfolgerung | 83 |
| 7 | Zusammenfassung | 84 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 85 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1.1 <i>Epithelial-mesenchymal transition</i> Typ 2 (EMT): Schematischer Querschnitt durch einen proximalen Tubulus | 2 |
| Abb. 1.2 Herkunft und Anteil der Fibroblasten in fibrotischen Prozessen | 3 |
| Abb. 1.3 Strukturformel des Sulfations..... | 4 |
| Abb. 1.4 Schematische Darstellung von Transportproteinen am Zellmodell..... | 6 |
| Abb. 1.5 Transport des Sulfats durch die proximale Tubuluszelle mithilfe von Transportern der <i>solute-carrier</i> -Familie..... | 7 |
| Abb. 1.6 Schematische Abbildungen des Zell-Zell-Kontakts von Epithelzellen unter Beteiligung von E-Cadherin..... | 11 |
| Abb. 1.7 Schematische Darstellung der Signalkaskaden im Kontext der EMT – Induktion in der fibrotischen Niere | 13 |
| Abb. 1.8 Schematische Darstellungen eines Nephrons | 15 |
| Abb. 4.1 Schematische Darstellung der PCR | 27 |
| Abb. 5.1 Photographische Aufnahmen von Zelllinie TK173 und Zelllinie TK188 nach 3-tägigem Wachstum unter normoxischen Bedingungen in <i>low-glucose</i> -Zellmedium. | 40 |
| Abb. 5.2 Nachweis von GAPDH und SAT-1 (SLC26A1) in den Zelllinien TK173 und TK188 mit und ohne Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage | 41 |
| Abb. 5.3 Nachweis von GAPDH und NaSi-1 (SLC13A1) in den Zelllinien TK173 und TK188 mit und ohne Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage | 41 |
| Abb. 5.4 Nachweis von GAPDH und E-Cadherin (CDH1) in den Zelllinien TK173 und TK188 mit und ohne Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage | 42 |
| Abb. 5.5 Photographische Aufnahmen der Zelllinien TK173 und TK188 in An- und Abwesenheit von TGF- β 1..... | 44 |
| Abb. 5.6 Zelllinie TK173: Gehalt der SAT-1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1 | 45 |
| Abb. 5.7 Zelllinie TK188: Gehalt der SAT-1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1..... | 46 |
| Abb. 5.8 Vergleich des SAT-1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188.. .. | 47 |

| | |
|---|----|
| Abb. 5.9 Zelllinie TK173: Gehalt der NaS _i -1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1..... | 48 |
| Abb. 5.10 Zelllinie TK188: Gehalt der NaS _i -1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1..... | 49 |
| Abb. 5.11 Vergleich des NaS _i -1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. | 50 |
| Abb. 5.12 Zelllinie TK173: Gehalt der α-sma-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1..... | 51 |
| Abb. 5.13 Zelllinie TK188: Gehalt des α-sma-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1..... | 52 |
| Abb. 5.14 Vergleich des α-sma-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. | 53 |
| Abb. 5.15 Zelllinie TK173: mRNA-Gehalt des epithelialen Markers E-CDH in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1 | 54 |
| Abb. 5.16 Zelllinie TK188: Gehalt des epithelialen Markers E-CDH in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1 | 55 |
| Abb. 5.17 Vergleich des E-CDH-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. | 56 |
| Abb. 5.18 Zelllinie TK173: Gehalt von SAT-1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 57 |
| Abb. 5.19 Zelllinie TK188: Gehalt von SAT-1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 58 |
| Abb. 5.20 Vergleich des SAT-1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 59 |
| Abb. 5.21 Zelllinie TK173: Gehalt von NaS _i -1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 60 |
| Abb. 5.22 Zelllinie TK188: Gehalt von NaS _i -1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 61 |
| Abb. 5.23 Vergleich des NaS _i -1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 62 |
| Abb. 5.24 Zelllinie TK173: Gehalt von α-sma in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Abb. 5.25 Zelllinie TK188: Gehalt von α -sma-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 64 |
| Abb. 5.26 Vergleich des α -sma-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 65 |
| Abb. 5.27 Zelllinie TK173: Gehalt von E-Cadherin-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 66 |
| Abb. 5.28 Zelllinie TK188: Gehalt von E-Cadherin in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 67 |
| Abb. 5.29 Vergleich des E-Cadherin-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie..... | 68 |
| Abb. 5.30 Nachweis von SAT-1-Protein nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie..... | 69 |
| Abb. 5.31 Darstellung der [³⁵ S]Sulfataufnahme in die Zelllinien TK173 und TK188 nach 24-stündiger Inkubation unter Normoxie (21% O ₂) und Hypoxie (1% O ₂)..... | 70 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 4.1 TGF- β 1-Konzentrationen | 25 |
| Tab. 4.2 Temperaturvorgaben und Zyklen für die PCR | 28 |
| Tab. 4.3 Mastermix für die PCR | 28 |
| Tab. 4.4 Temperaturvorgaben für die RNS-Denaturierung | 31 |
| Tab. 4.5 Mastermix für die cDNS-Umschreibung | 31 |
| Tab. 4.6 Temperaturvorgaben für die cDNS-Transkription | 31 |
| Tab. 4.7 Mastermix für die <i>real-time</i> PCR (qrtPCR) | 33 |
| Tab. 4.8 Temperaturvorgaben und Zyklen für die qrtPCR | 33 |
| Tab. 4.9 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel | 36 |
| Tab. 4.10 Auswirkung der Aufnahmemedien auf die Funktion der Transporter | 39 |
| Tab. 5.1 Aufnahme von [35 S]Sulfat in die Zelllinien TK173 und TK188 unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Abhängigkeit vom Aufnahmemedium | 71 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ANOVA | Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>) |
| α -sma | alpha-glattes Gefäßmuskelaktin (<i>alpha-smooth muscle actin</i>) |
| ATP | Adenosin <u>tr</u> iphosphat |
| cDNS | komplementäre <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleins <u>ä</u> ure |
| Δ Ct | Schwellenwert-Zyklus-Differenz (<i>Cycle Threshold</i>) |
| DIDS | <u>D</u> i <u>i</u> sothiocyano <u>s</u> tillbend <u>i</u> sulfonat |
| DMEM | <u>D</u> ul <u>b</u> ecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium |
| DNS | <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleins <u>ä</u> ure |
| dNTP | <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat |
| DRA | <u>D</u> own <u>R</u> egulated in <u>A</u> denoma |
| DTT | <u>D</u> ithio <u>t</u> reitol |
| E-CDH | <u>E</u> - <u>C</u> adherin |
| ECL | erhöhte <u>C</u> hemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>) |
| EDTA | <u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat |
| EMT | <i>epithelial-mesenchymal transition</i> |
| EndMT | <i>endothelial-mesenchymal transition</i> |
| EZM | <u>E</u> xtra <u>z</u> ellulär <u>m</u> atrix |
| FCS | fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| GAPDH | <u>G</u> lycerinaldehyd-3- <u>p</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase |
| HEPES | <u>H</u> ydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure |
| HIF-1/2 | <i>Hypoxia-inducible factor 1/2</i> |
| MLK1 | <i>megakaryoblastic leukemia factor-1</i> |
| M-MuLV | <u>M</u> oloney <u>M</u> urine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| NaSi-1 | <u>n</u> atriumabhängiger <u>S</u> ulfattransporter 1 |
| PAGE | <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese |
| PAS | <u>P</u> er- <u>A</u> rrt- <u>S</u> im |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PVDF | <u>P</u> oly <u>v</u> enylidend <u>i</u> fluorid |
| RNS | <u>R</u> ibo <u>n</u> ukleins <u>ä</u> ure |
| RT | <u>r</u> everse <u>T</u> ranskription |

| | |
|--------|---|
| SAT-1 | <u>S</u> ulfat- <u>A</u> nionen- <u>T</u> ransporter-1 |
| SD | Standardabweichung (<u>S</u> tandard <u>D</u> eviation) |
| SDS | Natriumlaurylsulfat (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate) |
| SLC | <u>S</u> olute <u>C</u> arrier |
| TBE | <u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer |
| TGF-β1 | <u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor - beta 1 |
| Tris | <u>T</u> rihydroxymethylaminomethan |
| UV | <u>U</u> ltraviolett |
| VEGF | <u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor |
| VSMC | <u>V</u> ascular <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ell |

1 Einleitung

Im Jahr 2006 waren 66 508 Patienten in Deutschland dialysepflichtig, davon begannen 17 548 Patienten in diesem Jahr erstmals mit einem chronischen Nierenersatzverfahren. Hauptursachen für die Dialysepflichtigkeit stellten Diabetes mellitus I/II, Glomerulonephritiden sowie vaskuläre Nephropathien dar (FREI und SCHÖBER-HALSTENBERG 2008).

1.1 Nierenfibrose

Nahezu jede chronische Nierenerkrankung, die letztendlich zu einer Dialysepflichtigkeit führt, ist mit einer Ablagerung von Extrazellulärmatrix in das Tubulointerstitium verbunden (EDDY 2000). Dieser fibrotische Prozess ist durch eine chronische Entzündungsreaktion charakterisiert, die zu einer Infiltration von mononukleären Zellen in das Interstitium führt (STRUTZ und NEILSON 1994). Die infiltrierenden Entzündungszellen, hauptsächlich Monozyten und Lymphozyten, besitzen die Eigenschaft, profibrotische Zytokine zu sezernieren. Unter diesen Zytokinen nimmt der *transforming growth factor - beta 1* (TGF- β 1) eine entscheidende Rolle ein, indem er durch Stimulation die ortsständigen Fibroblasten dazu anregt, sich in Myofibroblasten umzuwandeln. Ein Charakteristikum der Myofibroblasten ist die Expression von *alpha-smooth muscle-actin* (α -sma) (STRUTZ und MÜLLER 2006).

Neben diesen ortsständigen Fibroblasten könnte nach derzeitigem Wissensstand auch das tubuläre Epithel der Niere eine Quelle für Fibroblasten darstellen, das nach Umwandlung im Rahmen einer *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) zu Fibroblasten wird (STRUTZ et al. 1995) (Abb. 1.1). Nach einem aktuellen Klassifizierungsvorschlag wird diese EMT, die infolge einer chronischen Entzündung bzw. Wundheilung beobachtet wird und zu einer Organfibrose führen kann, als Typ 2 EMT bezeichnet (KALLURI und WEINBERG 2009). Die EMT des Typs 2 geht einher mit einem Verlust an epithelialen und einer Akkumulation von mesenchymalen Zellmarkern (ZEISBERG et al. 2002). Ebenso ist ein Verlust der apikal-basalen Zellpolarität beschrieben, der die Zelle über den Verlust des Basalmembrankontakts zur Migration befähigt (ZUK et al. 1989). Die losgelösten Zellen sind durch ihre Fähigkeit, invasiv in Gewebe einzudringen, und durch eine erhöhte Resistenz gegen

Apoptose biologisch bevorteilt (KALLURI und NEILSON 2003). Begleitet werden diese Prozesse von morphologischen Veränderungen der Zelle, insofern, als sie ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen annimmt und epitheliale Zellverbandsmarker wie beispielsweise das E-Cadherin herunterreguliert, während mesenchymale Marker wie das α -sma hochreguliert werden (STRUTZ und ZEISBERG 2006). In Mausmodellen konnte eine Beteiligung der EMT an der Menge der Matrixproduzierenden Zellen von bis zu 36 % gezeigt werden (IWANO et al. 2002). Auch in diesem Fall spielt das TGF- β 1 bei der Induktion der EMT eine entscheidende Rolle (OKADA et al. 1997).

Neueren Erkenntnissen zufolge könnte außer den Zytokinen auch die Hypoxie ein Auslöser der EMT sein, die über Expression des *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) zu einer Aktivierung der EMT-Kaskade und damit zu einer Fibrose führt (HIGGINS et al. 2007; HIGGINS et al. 2008).

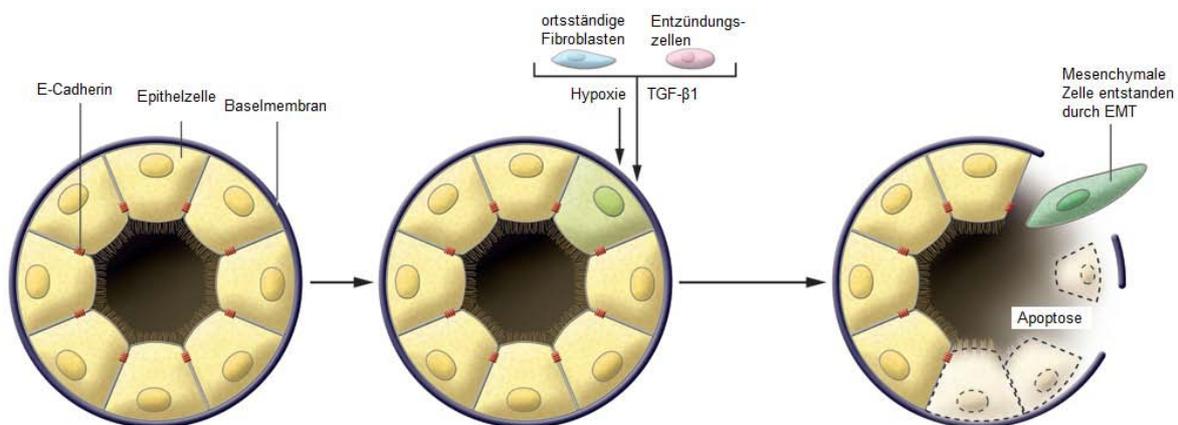


Abb. 1.1 Epithelial-mesenchymal transition Typ 2 (EMT): Schematischer Querschnitt durch einen proximalen Tubulus. Die Epithelzellen erhalten durch exogene Reize (Hypoxie, TGF- β 1) ein Signal, lösen sich aus ihrem Zellverband und unterziehen sich einer morphologischen und funktionellen Veränderung hin zu einer mesenchymalen Zelle (modifiziert nach KALLURI und WEINBERG 2009, S. 1423).

Neben der oben beschriebenen EMT, die sich auf die epithelialen Zellen bezieht, existiert neueren Studien zufolge auch eine *endothelial-mesenchymal transition* (EndMT), mithilfe derer Fibroblasten aus den endothelialen Zellen der Mikrovaskularisation entstehen können (POTENTA et al. 2008). Im Rahmen der Nierenfibrose könnten nahezu 35% der Fibroblasten über EndMT entstanden sein und den normalen endothelialen Zellen der Niere entstammen. Auch hier wird dem TGF- β 1 als Induktor der EndMT eine entscheidende Rolle zugesagt (KALLURI und

WEINBERG 2009). Jedoch konnten sowohl EMT als auch EndMT bisher wirklich eindeutig nur in in-vitro-Studien nachgewiesen werden (LIU Y 2010).

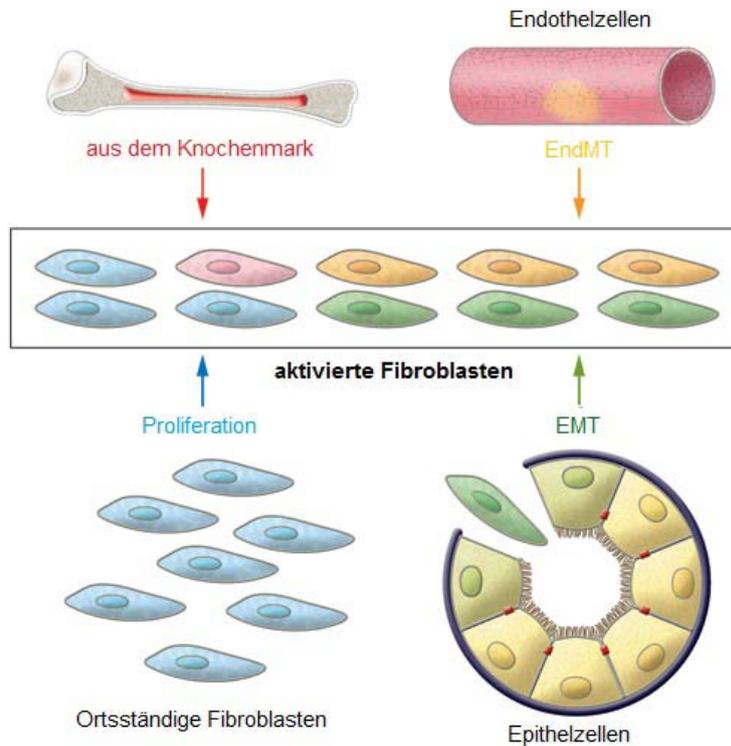


Abb. 1.2 Herkunft und Anteil der Fibroblasten in fibrotischen Prozessen. Es existieren verschiedene Quellen von Fibroblasten im Rahmen der Fibrose: Etwa 10% der Fibroblasten entstammen dem Knochenmark, etwa 30% entstehen jeweils über EMT bzw. EndMT und ebenfalls etwa 30% sind ortsständige Fibroblasten (modifiziert nach KALLURI und WEINBERG 2009, S. 1424).

1.2 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (EZM), die im Rahmen des fibrotischen Prozesses im Interstitium akkumuliert, wird größtenteils von Myofibroblasten bzw. Fibroblasten gebildet (STRUTZ und ZEISBERG 2006). Die Bestandteile der EZM sind zahlreich und kaum überschaubar. Unter ihnen besitzen vier Substanzen die größte Bedeutung. Hierzu zählen die Kollagene, die Proteoglykane, die Glykosaminoglykane sowie die nichtkollagenen Glykoproteine. Letztere besitzen Aufgaben in der Strukturgebung von Geweben.

Kollagene bestehen (JÄRVELÄINEN et al. 2009) aus einer rechtsgängigen Tripelhelix, die durch Zusammenlagerung dreier linksgängiger Kollagen- α -Ketten entsteht. Die Funktion des Kollagens besteht in der Strukturgebung der EZM.

Die Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern, der von Kohlenhydratseitenketten umgeben ist. Sie dienen der Stabilisierung zwischen den Zellen eines Gewebes.

Hauptbestandteil der EZM sind die Glykosaminoglykane. Diese bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die sich aus einer Uronsäure und einem Aminozucker zusammensetzen und zu langen Kohlenhydratketten verknüpft sind. Viele dieser Aminozucker tragen eine Sulfatgruppe. Hauptgruppen der Glykosaminoglykane sind Hyaluronat und Heparansulfat (RASSOW 2006). Folglich muss den Fibroblasten, die im Rahmen der Nierenfibrose große Mengen an EZM produzieren, für die Synthese von Glykosaminoglykanen eine ausreichende Menge an Sulfat zur Verfügung stehen.

1.3 Sulfatmetabolismus

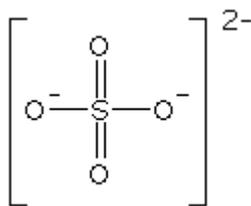


Abb. 1.3 Strukturformel des Sulfations

Anorganisches Sulfat (SO_4^{2-}) stellt einen der wichtigsten Makronährstoffe der Zelle dar, den nahezu alle Zellen für ihre physiologische Zellfunktion benötigen. Im Plasma liegt Sulfat in einer Konzentration von etwa $300 \mu\text{M}$ vor (COLE und SCRIVER 1980; TALLGREN 1980).

Quellen des Sulfats im menschlichen Körper stellen die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein dar, bei deren Abbau zu Kohlenstoffdioxid und Wasser Schwefelwasserstoff entsteht. Dieser wird durch enzymatische Oxidation als anorganisches Sulfat mit dem Urin ausgeschieden (SABRY et al. 1965; BROSNAN und BROSNAN 2006).

Die Regulation des Sulfathaushalts findet hauptsächlich in den Nieren statt. Bereits in sehr frühen Studien konnte gezeigt werden, dass Sulfat in den Nieren frei filtriert und sehr stark rückresorbiert wird. Der Hauptort der Sulfat-Rückresorption ist hierbei der proximale Tubulus (HIERHOLZER et al. 1960). Der Prozess der Rückresorption ist sättigbar und arbeitet unter physiologischen Sulfat-Plasmakonzentrationen bereits

nahe der maximalen Rückresorptionskapazität der daran beteiligten Transporter (LIN und LEVY 1983). Bei steigenden Sulfat-Plasmakonzentrationen wird die maximale Rückresorptionsrate überschritten und es folgt eine Ausscheidung des Sulfats über den Urin. Die renale Clearance von Sulfat steigt mit zunehmender Sulfat-Plasmakonzentration und kann ähnliche Werte wie die glomeruläre Filtrationsrate erreichen (MARKOVICH und ARONSON 2007).

Für den Transport des Sulfats durch die Zelle existieren in der apikalen und basalen Membran der proximalen Tubuluszellen, da Sulfat als hydrophiles Anion nicht passiv über die Zellmembran hinweg diffundieren kann (MARKOVICH und ARONSON 2007), Transportproteine vom Typ der *solute-carrier*-Familie, die einen Transport des Sulfats vom Lumen in die Zelle und über die basolaterale Membran in die Blutbahn ermöglichen (LÜCKE et al. 1979; ULLRICH et al. 1984; DAVID und ULLRICH 1992). Auf diese Transporter wird im Folgenden eingegangen.

1.4 Die *solute-carrier* (SLC) - Transporterfamilie

Die Anzahl der bekannten *solute carrier* umfasst inzwischen 46 Familien (Stand 2010) und mehr als 380 Mitglieder. Ein Transporter wird einer bestimmten Familie zugeordnet, wenn die Aminosäuresequenz des Transporters zu 20 – 25% Prozent der eines Mitglieds der Familie entspricht. Die SLC-Familie stellt damit nach den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die zweitgrößte Gruppe der Membranproteine im menschlichen Individuum dar (HEDIGER et al. 2004; FREDRIKSSON et al. 2008)

Transporter im Allgemeinen dienen als Transportweg für wichtige Komponenten der Zelle bzw. des Zellstoffwechsels wie Zucker, Aminosäuren, Nukleotide, Ionen und für die Funktion von Medikamenten in der Zelle. Dabei kann der Transport dieser Stoffe sowohl aktiv als auch passiv erfolgen. Der passive Transport erlaubt eine Passage von gelösten Stoffen durch die Zellmembran entlang eines chemischen oder elektrochemischen Gradienten, also eine Passage hin zum Ort einer niedrigeren Konzentration bzw. einer entgegen gerichteten Ladung oder einer Kombination von beidem. Beim aktiven Transport, den man in einen primär-aktiven und sekundär-aktiven Transport unterscheidet, wird unter Verbrauch von ATP ein elektrochemischer Gradient durch Ionen- bzw. Stofftransport errichtet. Dieses geschieht zumeist in einem festen stöchiometrischen Verhältnis (HEDIGER et al. 2004).

Neben Transportern existieren Kanäle innerhalb der Zellmembranen, die einen *single file* Fluss von gelösten Stoffen entlang ihres elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Der Fluss durch einen Kanal ist dabei abhängig von der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bzw. dessen *single channel conductance* (Anzahl von Ladungen pro Sekunde bei gegebener Spannung) (HEDIGER et al. 2004).

Innerhalb der SLC-Familie existieren Symporter, Uniporter, Austauschler sowie mitochondriale und vesikuläre Transporter (Abb. 1.4). Primär-aktive Transporter finden sich in der SLC-Familie nicht (HOGLUND et al. 2010).

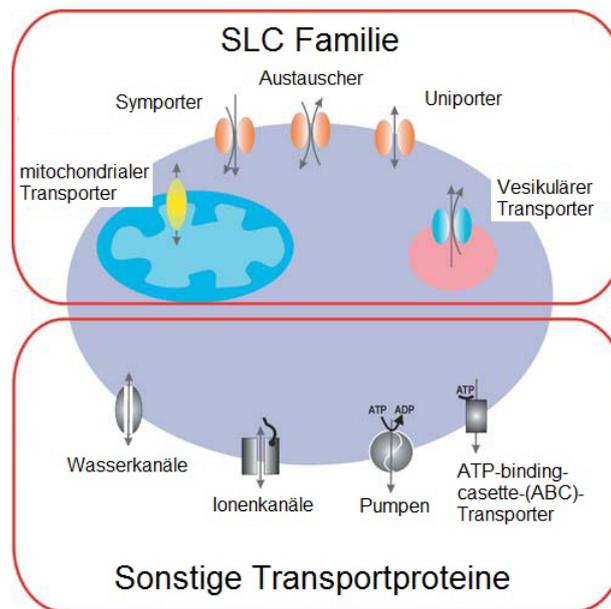


Abb. 1.4 Schematische Darstellung von Transportproteinen am Zellmodell. Im oberen Bereich dargestellt sind die Transportproteine, die in der SLC-Familie vertreten sind. Diese finden sich sowohl in den Zellkompartimenten als auch in der Zellmembran. Im unteren Bereich finden sich die sonstigen Transportproteine, die in der SLC – Familie nicht vorkommen. Diese Transportproteine finden sich vornehmlich in der Zellmembran (modifiziert nach HEDIGER et al. 2004, S. 465).

Die Bedeutung der SLC - Familie wird im medizinischen Alltag häufig erst bei einem Defekt eines der Transporter deutlich. Eine Mutation im SLC26A4 beispielsweise führt zu Taubheit (Pendred Syndrom), eine Veränderung im SLC37A4, einem Gen, das für einen Glukose-6-Phosphat – Transporter kodiert, führt zu einer Glykogenspeicherkrankheit. Veränderungen im SLC40A1-Gen führen zum Bild der Hämochromatose. In den Nieren führen Mutationen im SLC12A1-Gen, dem renalen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ - Cotransporter, zum Bartter-Syndrom, Mutationen im SLC12A3-Gen, dem renalen $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ - Cotransporter, zum Gitleman-Syndrom (HEDIGER et al. 2004).

Im Rahmen der Sulfat-Homöostase in den Nieren spielen, wie in Abb. 1.5 dargestellt, jedoch hauptsächlich zwei Transporter eine entscheidende Rolle. Zum einen ist dieses der $\text{NaS}_i\text{-1}$ (Genname: SLC13A1), ein apikal gelegener $\text{Na}^+\text{-SO}_4^{2-}$ -Symporter, der das Sulfat in die Zelle transportiert, und zum anderen der basolateral gelegene Transporter SAT-1 (Genname: SLC26A1), der das Sulfat im Austausch gegen ein Anion aus der Zelle transportiert (MARKOVICH und ARONSON 2007).

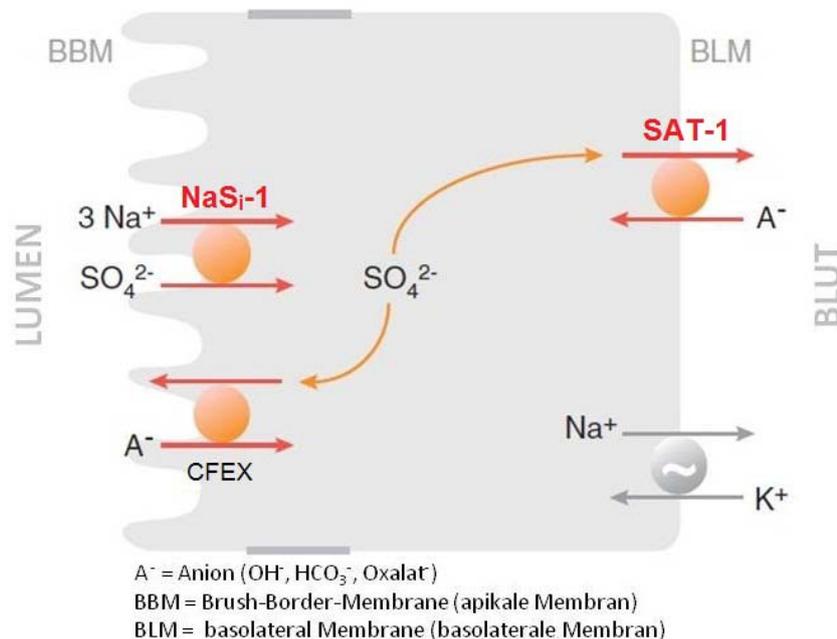


Abb. 1.5 Transport des Sulfats durch die proximale Tubuluszelle mithilfe von Transportern der *solute-carrier-Familie*. Aufnahme eines Sulfat-Ions durch den $\text{NaS}_i\text{-1}$ im Symport mit 3 Na^+ und Ausschleusung durch den SAT-1 im Austausch gegen ein Anion. Außerdem kann das Sulfat die Zelle erneut apikal durch den CFEX (Chlorid-Formiat-Austauscher) im Austausch gegen ein Anion verlassen. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ erhält den zellulären elektrochemischen Gradienten aufrecht (modifiziert nach MARKOVICH und ARONSON 2007, S. 364).

1.4.1 Natriumabhängiger Sulfattransporter - 1 ($\text{NaS}_i\text{-1}$, Genname: SLC13A1)

Der Genort für den humanen natriumabhängigen Sulfattransporter $\text{NaS}_i\text{-1}$ liegt auf Chromosom 7q31-q32. Er umfasst 15 Exons und 14 Introns und erstreckt sich über eine Länge von 87 kb (BECK und MARKOVICH 2000). Im Menschen scheint der Transporter, soweit bekannt, mit 13 Transmembrandomänen, dessen N-Terminus intrazellulär und dessen C-Terminus extrazellulär liegt (MARKOVICH 2001), ausschließlich in der apikalen Membran der Nierenzellen des proximalen Tubulus exprimiert zu sein. In der Ratte findet sich die $\text{NaS}_i\text{-1mRNS}$ hingegen neben den

Nieren auch im Darm, wo der Transporter intestinal an der Sulfathomöostase beteiligt ist. Dieses könnte für die Sulfathomöostase im Menschen zwei Bedeutungen haben: Entweder findet die Sulfathomöostase alleine über die Nieren statt oder der im menschlichen Darm vertretene DRA (*Down Regulated in Adenoma*), ein intestinaler Sulfat / Chlorid-Austauscher aus der SLC26-Familie, übernimmt diese Aufgabe im Darm (SCHWEINFEST et al. 1993; LEE et al. 2000). Die Aminosäuresequenzen des NaS_i-1 innerhalb der verschiedenen Spezies zeigen große Ähnlichkeiten. So ähneln sich die Sequenzen zwischen Mensch und Maus zu 94%, zwischen Mensch und Ratte zu 83% (LEE et al. 2000).

Ein Natrium-abhängiger Transport von Sulfat über die Zellmembran konnte bereits früh beschrieben werden. (LÜCKE et al. 1981; TURNER 1984; BÄSTLEIN und BURCKHARDT 1986). Der hierfür zuständige Transporter konnte später als NaS_i-1 identifiziert werden und spielt eine entscheidende Rolle in der Sulfathomöostase des Körpers. Die biologische Funktion des NaS_i-1 besteht in einem sekundär-aktiven natriumabhängigen Sulfat-Transport über die apikale Membran der proximalen Nierentubuluszelle in die Zelle (Abb. 1.5) (MARKOVICH et al. 1993; MARKOVICH et al. 1994). Das Verhältnis von Natrium zu SO₄²⁻ beträgt 3:1. Der NaS_i-1 ist folglich ein elektrogener Symporter (MARKOVICH und MURER 2004). Kompetitive Inhibitoren des Sulfattransports – und damit weitere Substrate für den NaS_i-1 – stellen Thiosulfat, Molybdat, Wolframat, Citrat, Selenat sowie Succinat dar, wobei letzteres lediglich die Aufnahme von Sulfat inhibiert, jedoch nicht transportiert wird (BUSCH et al. 1994; LEE et al. 2000). Die Rolle des NaS_i-1 in der Sulfathomöostase wird durch einen *knock-out* von NaS1 (NaS_i-1-äquivalenter Transporter in der Maus) im Mausmodell deutlich: Die Sulfatexkretion dieser *knock-out*-Mäuse im Urin steigt an und es kommt zu einer Hyposulfatämie, die in einer Wachstumsretardierung, verminderter Fertilität sowie Verhaltensauffälligkeiten mündet (DAWSON et al. 2003). Während die Transkription des Transporters in der Maus durch Vitamin D, das Schilddrüsenhormon T3 und Glukokortikoide aktivierbar zu sein scheint, ist dieses im Menschen nicht der Fall, da die entsprechenden Promotorregionen dort fehlen oder trotz Anwesenheit von Vitamin D bzw. dem Schilddrüsenhormon T3 nicht aktiviert werden konnten. Allerdings konnte die humane NaS_i-1-Promotorregion durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie z.B. das 3-Methylcholanthren (ein starkes Karzinogen), aktiviert werden (LEE und MARKOVICH 2004).

1.4.2 Sulfat-Anionen-Transporter-1 (SAT-1, Genname: SLC26A1)

Der Sulfat-Anionen-Transporter-1 gehört zu einer vielseitigen SLC-Familie mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Das SAT-1-Protein besteht aus 701 Aminosäuren und bildet 12 Transmembrandomänen, deren C- und N-Termini intrazellulär liegen. Das Protein hat eine Größe von 75 kDa. Der codierende Bereich des Gens beinhaltet 4 Exons mit einer Länge von etwa 5,8 kb (REGGEER et al. 2003) auf Chromosom 4p16.3 (SCOTT et al. 1990). Trotz großer Ähnlichkeiten der Promotorregionen von SAT-1 mit *response elements* für Vitamin D und das Schilddrüsenhormon T3 konnten im humanen SAT-1 bisher keine Effekte durch Vitamin D bzw. T3 gezeigt werden (MARKOVICH und ARONSON 2007).

Bisher konnten 3 humane Spleißvarianten des SAT-1 identifiziert werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. Das Spleißen betrifft dabei das Exon II, durch das zwei Transkripte mit einer Differenz von 215 bp entstehen. Diese beiden Transkripte werden als Isoform a bezeichnet. Die Lokalisation des Exons im untranslatierten Bereich scheint jedoch keinen Einfluss auf die Proteinaktivität zu haben (REGGEER et al. 2003). Das dritte Transkript, die Isoform b, entsteht durch ein fehlendes Exon und ein alternatives 3'-Exon und besteht aus 224 Aminosäuren.

Es existieren Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz des humanen SAT-1 (hsat-1) mit anderen SLC26-Proteinen. So gleichen die Aminosäuresequenzen von hsat-1 denen der Ratte (rsat-1) zu 78%, zu 77% denen der Maus (msat-1) und zu 44% dem humanen *D*ia*s*t*r*o*p*h*i*c *D*y*s*p*l*a*s*ia *S*u*l*f*a*t*e* - *T*ra*n*sp*o*r*t*e*r* (hDTDST, Genname SLC26A2) (REGGEER et al. 2003). Dieser Transporter ist somit der engste Verwandte des SAT-1 und transportiert Chlorid im Austausch gegen Sulfat. Er ist ähnlich dem SAT-1 ubiquitär exprimiert, besonders stark jedoch im Knorpel, wo er das Sulfat für die Proteoglykane in der Knorpelgenese bereitstellt (SATO et al. 1998).

Die Expression von SAT-1 kann im Gegensatz zum NaS_i-1 fast schon als ubiquitär bezeichnet werden, denn während NaS_i-1 im Menschen ausschließlich in den Nieren exprimiert zu sein scheint, konnte SAT-1-mRNS neben einer hohen Expression in den Nieren und der Leber auch in Pankreas, Gehirn, Hoden, Dünndarm, Dickdarm, Thymus, Leukozyten, Prostata und Lungen nachgewiesen werden (MARKOVICH 2001).

Der humane SAT-1 zeigt eine Substratspezifität für Sulfat ($K_m=0,19$), Chlorid und Oxalat (REGGEER et al. 2003). Die Funktion des SAT-1 besteht im Rahmen der

Sulfathomöostase in den Nieren in einem elektroneutralen Austausch eines Sulfatons gegen mono- oder divalente Anionen wie Chlorid, Bikarbonat oder Oxalat (MARKOVICH 2001; REGEER et al. 2003; KRICK et al. 2009) über die basolaterale Membran der Tubuluszelle (Abb. 1.5). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Formiat kein Substrat des SAT-1 darstellt. Gehemmt werden konnte die Aufnahme von Sulfat durch Molybdat, Selenat, Wolframat, Stilbenderivate, Bikarbonat, Thiosulfat und Phenolrot (REGEER et al. 2003; KRICK et al. 2009).

Die Relevanz des SAT-1 wird, ebenso wie bei NaS_1 , bei einem Fehlen des Transporters deutlich. In Mausmodellen mit mSat-1 (SAT-1-äquivalenter Transporter in der Maus)-*knock-out*-Mäusen wurde gezeigt, dass ein Verlust des mSat-1 zu einer Hyperoxalaturie und Hypersulfaturie, gekoppelt mit einer Hyperoxalämie und Hyposulfatämie, führt. Zusätzlich war das Auftreten von Kalzium-Oxalat-Kristallen in den Nieren sowie der Blase erhöht und Leukozyteninfiltrationen entlang der Nierenrindengefäße konnten beobachtet werden (DAWSON et al. 2010).

1.5 E-Cadherin (E-CDH, CDH1)

Das E-Cadherin (Epitheiales Cadherin) gehört zu einer großen Familie von transmembranösen bzw. membranassoziierten Glykoproteinen, die kalziumabhängig sind und Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Die Cadherin-Familie besteht dabei aus wenigstens 5 Subfamilien, von denen das E-Cadherin der ersten, klassischen Familie zugeordnet wird (HULPIAU und VAN ROY 2009) und gleichzeitig den ersten identifizierten Vertreter der Cadherine darstellt (TAKEICHI 1977). Das E-Cadherin-Gen (CDH1) ist auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert. Das Protein besteht aus einer Transmembrandomäne, einer kleinen zytoplasmatischen Domäne und 5 extrazellulären Domänen. Seine Gesamtmasse beträgt 120 kDa (NOLLET et al. 2000; VAN ROY und BERX 2008). Die Funktion von E-Cadherin besteht in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten im Rahmen von *adherens junctions* (Abb. 1.6a). Die Bedeutung von E-Cadherin wird an Versuchen mit *knock-out*-Mäusen deutlich. Diese sterben bei Fehlen von E-Cadherin bereits intrauterin (LARUE et al. 1994; MARRS und NELSON 1996). Die genaue Art der Bindung zwischen zwei benachbarten E-Cadherinen ist noch Gegenstand aktueller Forschung, jedoch scheint die Domäne 1 des extrazellulären Cadherins eine hydrophobe Tasche

entscheidende Rolle bei der Wundkontraktion nach Verletzungen spielen und hier auch zuerst entdeckt worden sind (MAJNO et al. 1971). Sie gelten im Rahmen der Nierenfibrose als aktivierter Fibroblasten-Phänotyp, der großen Anteil an der Produktion der EZM hat (STRUTZ und ZEISBERG 2006). Die Identifikation der Myofibroblasten wird häufig anhand der α -sma-Expression vorgenommen, was jedoch, wie oben erwähnt, kein alleiniges Merkmal der Myofibroblasten ist (KALLURI und ZEISBERG 2006). Die starke Zunahme von α -sma in der fibrotischen Niere könnte neben den Myofibroblasten, Perizyten und VSMC auch durch eine de-novo- α -sma-Synthese von Zellen, die vorher kein α -sma produziert haben, zu erklären sein (STRUTZ und ZEISBERG 2006). Folglich ist α -sma zwar ein einfacher und gut zu bestimmender Marker, kann jedoch nur näherungsweise als quantitatives Maß für die Myofibroblasten-Anzahl in einem Gewebe verstanden werden (OKADA et al. 2000; STRUTZ und ZEISBERG 2006).

In der Promotorregion des α -sma konnten eine Reihe von *response elements* und *motifs* entdeckt werden. Darunter befindet sich neben einem TGF- β 1-Kontroll-Element auch eine TGF- β 1-Hypersensitivitätsregion (HAUTMANN et al. 1997; ELBERG et al. 2008). Analog dazu konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass in renalen Tubulusepithelzellen der *megakaryoblastic leukemia factor - 1* (MKL-1) exprimiert sein muss, um eine Expression von α -sma durch TGF- β 1 zu induzieren. Es kann also vermutet werden, dass TGF- β 1 die α -sma-Expression durch MKL1 vermittelt (ELBERG et al. 2008).

1.7 Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1)

Die Superfamilie des *transforming growth factor - beta 1* (TGF- β 1) besteht aus mehr als 30 Mitgliedern, einschließlich 3 unterschiedlichen TGF- β und über 20 *bone morphogenic proteins* (BMP) (MASSAGUE 1998). Da man zunächst davon ausgegangen war, dass TGF- β 1 ausschließlich Wachstum induziert, wurde es als Wachstumsfaktor (*growth factor*) bezeichnet (DE LARCO und TODARO 1978). Wenig später jedoch erkannte man, dass dieses Zytokin eine Fülle von verschiedenen Funktionen hat. Neben der Induktion von Zellwachstum kann es dieses auch inhibieren (SHIPLEY et al. 1986). Außerdem kann TGF- β 1 die Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellmigration und die Produktion von Extrazellulärmatrix sowie unzählige weitere, die zelluläre Mechanismen betreffende

Prozesse modulieren (DENNLER et al. 2002). Da das Zytokin TGF- β 1 nahezu ubiquitär sezerniert wird und, wie oben beschrieben, einen entscheidenden Einfluss auf die Zellfunktion hat, bedarf es einer strikten Regulation seiner biologischen Aktivität. Aus diesem Grund wird TGF- β 1 zunächst als Vorstufe sezerniert, die durch nichtkovalente Bindung der N-terminalen Domäne an das C-terminale bioaktive Dimer eine Bindung an den TGF- β 1-Rezeptor verhindert. Diese Inaktivierung kann durch Proteasen aufgehoben werden (LAWRENCE 2001). Ein weiterer „Sicherungsmechanismus“ besteht in der kurzen Halbwertszeit des aktiven TGF- β 1, sodass es bei auto- bzw. parakriner Sekretion des Zytokins zu einer möglichst auf das Organ beschränkten Wirkung von TGF- β 1 kommt (WAKEFIELD et al. 1989). Der spezifische TGF- β 1-Rezeptor in der Zellmembran besteht aus einem transmembranösen Heterodimer mit intrinsischer Serin-Threonin-Kinase-Aktivität (MASSAGUE und WOTTON 2000). Bei Ligandenbindung phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor den Typ-I-Rezeptor (Abb. 1.7), was zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Aktivierung der Kinase führt (WRANA et al. 1994).

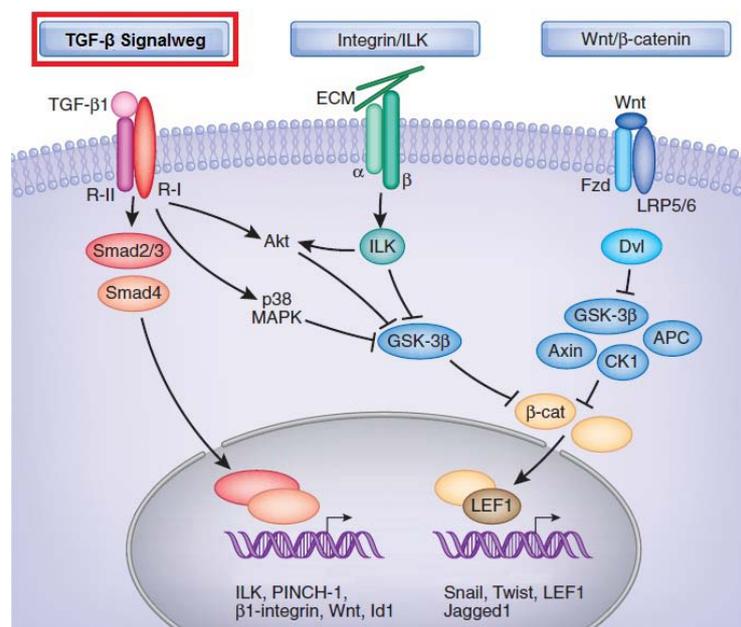


Abb. 1.7 Schematische Darstellung der Signalkaskaden im Kontext der EMT – Induktion in der fibrotischen Niere. Neben einer Vielzahl von Stimuli, die eine EMT induzieren können, sollen hier die drei Hauptsignalkaskaden für die Induktion von EMT in der Niere, wobei als wichtigste die des TGF- β 1-Rezeptors (roter Kasten) gilt, aufgezeigt werden (modifiziert nach LIU Y 2010, S. 216).

Die intrazelluläre Signalkaskade beginnt durch die Phosphorylierung von Smad2 oder Smad3 durch den Typ-I-Rezeptor. In der Folge bilden Smad2 bzw. Smad3 mit

dem Co-Smad4 ein Heteromer. Dieser heteromere Komplex akkumuliert im Nukleus der Zelle und beeinflusst so die Expression von Zielgenen über Smad-Bindeelemente (DENNLER et al. 2002; DERYNCK und ZHANG 2003).

Die Bedeutung von TGF- β 1 für die Nierenfibrose wird deutlich, wenn man die in Kapitel 1.1, 1.5 und 1.6 genannten Folgen des TGF- β 1-Einflusses betrachtet. TGF- β 1 beeinflusst die Expression von E-Cadherin negativ, die von α -sma positiv und ist damit ein Wegbereiter der EMT. Die Hauptwirkung für die Fibrose erzielt TGF- β 1 dabei über die Smad3-abhängige Kaskade. Dieses konnte in Smad3^{-/-} - Mäusen gezeigt werden, bei denen, infolge des Smad3-Verlustes, keine oder nur sehr verzögert eine EMT und tubulointerstitielle Fibrose beobachtet werden konnte (SATO et al. 2003). Für die gesteigerte Expression von α -sma sind hingegen Smad2 und Smad3 erforderlich (PHANISH et al. 2006). Neben der Smad-abhängigen Kaskade existieren noch weitere Signalwege (Abb. 1.7), wie beispielsweise die des Integrin- und Wnt-Signalwegs, deren einzelne Bedeutungen aufgrund der vielen Interaktionen mit dem Smad-Signalweg bisher noch nicht eindeutig geklärt sind (WILLIS und BOROK 2007).

1.8 Hypoxie

Sauerstoff spielt im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung eine wichtige Rolle als terminaler Elektronentransporter im Komplex IV der Atmungskette, die für die Produktion des Energielieferanten ATP essentiell ist (RASSOW 2006). Die Unterversorgung mit Sauerstoff hat demnach einen ATP-Mangel zur Folge, der seinerseits zu einer Apoptose führt. Im Menschen sind schwerwiegende Folgen akuter Hypoxie unter anderem in Form von Myokardinfarkt oder Schlaganfall bekannt (SEMENZA 2000). Auch bei der Entstehung von schwerwiegenden Nierenerkrankungen, die zur terminalen Niereninsuffizienz führen, spielt die Hypoxie eine entscheidende Rolle (FINE et al. 2000; MANOTHAM et al. 2004a). In späteren Stadien der Nierenerkrankung entsteht durch vorangegangene Fibrose bzw. Nierenschädigung ein Schaden an den renalen Arterien und Arteriolen, der in der Folge zu einer Hypoxie und dadurch zu weiterer Fibrose führt, indem durch die Hypoxie entweder eine EMT induziert oder ortsständige Fibroblasten aktiviert werden (NANGAKU 2006). Auch in frühen Stadien anderer Nierenerkrankungen, wie zum Beispiel einer Glomerulosklerose, bei der zunächst noch kein tubulointerstitieller

Schaden aufgetreten ist, kann durch Schäden an übergeordneten Systemen wie den Glomeruli eine peritubuläre Hypoxie resultieren (MATSUMOTO et al. 2004). Außerdem kann ein Überangebot vasoaktiver Substanzen, wie beispielsweise des Angiotensin II, eine intrarenale Vasokonstriktion mit konsekutiver Hypoxie auslösen. Einen weiteren Faktor für einen frühen Nierenschaden durch Hypoxie stellt die Anämie dar, die Hypoxie durch ein vermindertes Sauerstoffangebot im Blut erzeugt (NANGAKU 2006). Eine Übersicht der Ursachen für frühe Nierenschäden durch Hypoxie ist in Abb. 1.8b dargestellt.

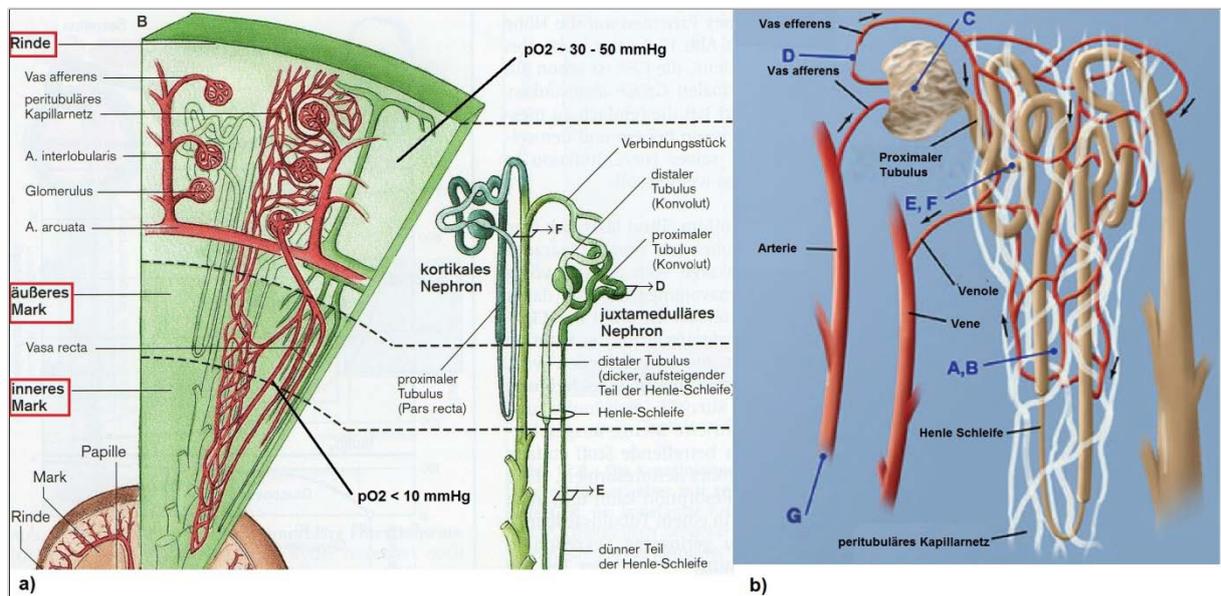


Abb. 1.8 Schematische Darstellungen eines Nephrons. a) Abgebildet ist ein Nephron mit seinen Anteilen und gemäß der Verteilung über Mark und Rinde inklusive der dort herrschenden Sauerstoffpartialdrücke. (modifiziert nach KLINKE et al. 2005, S. 332). b) Darstellung der verschiedenen Angriffspunkte der Hypoxie im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung: A) Verlust des peritubulären Kapillarnetzes, B) verminderte Sauerstoffdiffusion als Resultat von Nierenfibrose, C) Abnahme des peritubulären Blutflusses aufgrund von Sklerose der übergeordneten Glomeruli, D) verminderter peritubulärer Blutfluss als Folge eines Ungleichgewichts vasoaktiver Substanzen, E) inkorrektener Energieverbrauch als Resultat einer Entkopplung der Atmungskette durch oxidativen Stress, F) gesteigerter Verbrauch der Tubuluszellen und G) vermindertes Sauerstoffangebot durch Anämie (modifiziert nach NANGAKU 2006, S. 18).

Um auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff zu reagieren, existiert eine Vielzahl von Genen, die eine kompensatorische Antwort zu generieren versuchen. Eine dieser Antworten wird durch einen Transkriptionsfaktor mit Sauerstoff-sensitivem und basischem Helix-Schleifen-Helix- sowie Per-Arnt-Sim (PAS)-Motiv, dem sogenannten *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), erzeugt (WANG und SEMENZA 1995; MANOTHAM et al. 2005). HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten, wobei die β -Untereinheit konstitutiv exprimiert wird, jedoch regulatorisch keine direkte Rolle zu

spielen scheint. Die α -Untereinheit wird zwar konstitutiv transkribiert, in der Gegenwart von Sauerstoff jedoch sehr schnell degradiert. Es scheint sich bei der α -Untereinheit also um die Sauerstoff-sensitive, regulatorische Einheit zu handeln, deren Hypoxie-kompensierende Funktion unter anderem in einer Induktion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (MANOTHAM et al. 2005), sowie des *Endothelial Survival Factors* Adrenomedullin (SANDNER et al. 2004), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (ZHANG et al. 2003) und Angiopoietin (KELLY et al. 2003) besteht.

In den menschlichen Nieren konnte HIF-1 α im Nierenmark nachgewiesen werden. Vor allem im inneren Nierenmark, in dem das Sauerstoffangebot am niedrigsten ist, wird HIF-1 α konstitutiv exprimiert, während es in der sauerstoffreicheren Nierenrinde bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Die Sauerstoffpartialdrücke unterscheiden sich signifikant zwischen Nierenrinde ($pO_2 \sim 30 - 50$ mmHg) und Nierenmark ($pO_2 < 10$ mmHg), was sich durch den unterschiedlichen Blutfluss in beiden Regionen erklären lässt (MANOTHAM et al. 2005) (Abb. 1.8a). Der Blutfluss in der Rinde muss für die glomeruläre Filtration und Reabsorption, die unter anderem auf hydrostatischen Prinzipien beruht, höher sein als im Nierenmark, in dem ein osmotischer Gradient zur Urinkonzentration aufrecht erhalten werden muss und nicht „ausgespült“ werden darf (BREZIS und ROSEN 1995).

Hypoxie spielt bei vielen Arten der Nierenschädigung eine Rolle. Auch in der Entstehung der Nierenfibrose kann im Rahmen der EMT durch Hypoxie ein Verlust von Zell-Zell-Kontakten und Transdifferenzierung von Tubulusepithelzellen hin zu Myofibroblasten beobachtet werden (MANOTHAM et al. 2004b). In neueren Studien konnten Kida *et al.* – und später Sun *et al.* in humanen Tubulusepithelzellen – mit *Twist* einen basischen Helix-Schleife-Helix-Transkriptionsfaktor anführen, der entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von EMT zu nehmen scheint (KIDA et al. 2007; SUN S et al. 2009). Unter hypoxischen Bedingungen war die Expression von *Twist* hochreguliert, ebenso die von α -sma und es konnte eine verminderte Expression von E-Cadherin beobachtet werden. Passend dazu konnte in der Promotorregion von *Twist* ein HIF-1 α -Bindeelement entdeckt werden, was vermuten lässt, dass HIF-1 α über *Twist* zur Entstehung von EMT beitragen könnte. Die genauen Mechanismen zur Expression und Regulation von *Twist* sind jedoch bisher unklar (SUN S et al. 2009).

2 Fragestellung

Die Rolle der beiden Transporter $\text{NaS}_i\text{-1}$ und SAT-1 im Rahmen der physiologischen Sulfathomöostase des menschlichen Körpers konnte in mehreren Studien bereits eindrücklich nachgewiesen werden. Fraglich ist jedoch, welche Rolle diese beiden Transporter bei dem pathologischen Bild der Nierenfibrose sowie deren Entstehung spielen. Dass die an der Fibrose beteiligten Fibroblasten zur Bildung von Extrazellulärmatrix Sulfat benötigen (siehe Kap. 1.4), ist unstrittig. Es ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt, auf welchem Weg die Fibroblasten der Zelllinien TK173 und TK188 das hydrophile Sulfat transportieren. Deshalb soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Transporter $\text{NaS}_i\text{-1}$ und SAT-1 hierbei eine Rolle spielen könnten, also in den untersuchten Zelllinien exprimiert werden. Im Anschluss daran soll der Einfluss von Hypoxie und TGF- β 1 – beide bekannt als Induktoren einer Fibrose im Rahmen einer EMT – auf die beiden Zelllinien im Hinblick auf die Transporter-Expression untersucht werden, denn der Einfluss von TGF- β 1 auf renale Fibroblasten und deren Sulfattransporter ist bisher nur unzureichend geklärt.

Der Einfluss von TGF- β 1 sowie von Hypoxie auf den epithelialen Marker E-CDH und den Fibrosemarker α -sma im Rahmen einer Fibrosierung konnte, wie in der Einleitung beschrieben, bereits in Studien gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit soll dieser Einfluss im Speziellen auf die renalen Zelllinien TK173 und TK188 untersucht werden. Während viele Versuche zu diesem Thema bisher nur an Maus- bzw. Rattenmodellen durchgeführt wurden, stellen diese beiden Zelllinien ein gutes humanes in-vitro-Modell dar.

3 Material

3.1 Oligonucleotidprimer

Die sequenzspezifischen Oligonucleotidprimer zum Nachweis der sulfattransportierenden Systeme, der epithelialen Marker sowie der Fibrosemarker wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind im Folgenden aufgelistet.

| Protein (Gen) | Primer | Sequenz 5' – 3' | Produktlänge | Anneal. Temp. | Zyklen | Gel |
|-------------------------------|--------------------|---|--------------|---------------|--------|------|
| GAPDH (GAPDH) | 334for 905rev | TCA CCA TCT TCC AGG AGC G CTG CTT CAC CAC CTT CTT GA | 572 bp | 58°C | 22 | 1,5% |
| SAT-1 (SLC26A1) | 700for 953rev | GCC AAC CTC ATC TAC TTC CTC TGG TAA AGC CCG GTC ATC AG | 254 bp | 56°C | 35 | 2% |
| NaS _i -1 (SLC13A1) | 165for 393rev | TTT GGC TCA CAG AAG CAT TG AGC CAT GCA GGA TTT ACA CC | 228 bp | 55°C | 40 | 2% |
| E-CDH (CDH1) | 1156for 1739rev | GGT TCA AGC TGC TGA CCT TC TGT CCG GAT TAA TCT CCA GC | 583 bp | 53°C | 35 | 1,5% |
| α-sma (ACTA2) | 38for 471rev | AGG AGT TCC GCT CCT CTC TC GGA GCT GCT TCA CAG GAT TC | 433 bp | 55°C | 35 | 1,5% |

3.2 Real-time PCR Assay

Die *real-time* PCR Assays wurden bei der Firma Applied Biosystem (Foster City, CA, USA) erworben und sind im Folgenden aufgeführt.

| Protein (Gen) | Assay | Spleißvariante |
|--------------------------------|---------------|----------------|
| hGAPDH (hGAPDH) | Hs99999905_m1 | NM_002046.3 |
| hSAT-1 (SLC26A1) | Hs00758185_m1 | NM_134425.1 |
| hNaS _i -1 (SLC13A1) | Hs00223705_m1 | NM_134425.1 |
| E-CDH (CDH1) | Hs01013959_m1 | NM_004360.3 |
| α-sma (ACTA2) | Hs00426835_g1 | NM_001613.2 |

3.3 Antikörper

Die für den Western Blot verwendeten Antikörper sind im Folgenden aufgeführt.

| Antikörper | Konzentration | Anbieter |
|--------------------------------------|---------------|--|
| β-actin (monoklonales Maus-IgG) | 0,1 mg / ml | Dianova / DLN-07274 |
| Ziege anti-Maus IgG | 1 mg / ml | Calbiochem / 401215 |
| SLC26A1 (polyklonales Kaninchen-IgG) | 1 mg / ml | Aviva Systems Biology / ARP 44028_P050 |
| Ziegen anti-Kaninchen IgG | 0,4 mg / ml | Santa Cruz Biotechnology / sc-2004 |

3.4 Zellmaterial

Die Zellen der Linien TK173 und TK188, die bei den Versuchen eingesetzt wurden, entstammen humanen Nierenbiopsien, die von der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Georg-August-Universität Göttingen aufbereitet und zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben liegen vollständig anonymisiert vor.

Bei beiden Zelllinien handelt es sich um Fibroblastenkulturen. Während die Zellen der Linie TK173 einer morphologisch gesunden humanen Niere entstammen, sind die Zellen der Linie TK188 aus einer Niere mit tubulointerstitieller Fibrose bei

bekannter IgA-Nephritis entnommen worden, stellen damit also das pathologische Korrelat zur Zelllinie TK173 dar.

3.5 Medien, Lösungen, Puffer

Alle Zellkulturmedien wurden autoklaviert.

| Medium, Lösung, Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| Agarosegel-Elektrophorese Ladepuffer 5x | 6,3 g Glycerol 2 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) pH 8,0 50 µl Trishydroxymethylaminomethan (Tris) HCl pH 7,6 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 0,001 % (w/v) Xylencyanol FF aufgefüllt auf 10 ml mit nukleasefreiem aqua dest. |
| Ampicillin (Stammlösung) ➔ USB, US11259 | 100 mg / ml in aqua dest. |
| Bradford Lösung 4x | 0,4 g Coomassie Brilliant Blue G-250 200 ml Äthanol 400 ml 1 N Phosphorsäure aufgefüllt auf 1 l mit H ₂ O |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose (LG) ➔ Applichem, A1314,9050 | 10,03 g DMEM-LG 3,7 g NaHCO ₃ (pulverisiert) aufgefüllt auf 1 l mit aqua dest. vor Verwendung als Medium zugefügt: 200 mg Glutamin Penicillin (100 U / ml Medium) Streptomycin (100 µg / ml Medium) 50 ml 10% "Fetal Calf Serum" |
| Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung | 100 mM Tris/HCl pH 8,5 2,65 mM H ₂ O ₂ 1,25 mM Luminol in Dimethylsulfoxid (DMSO) 0,225 mM Coumarsäure in DMSO |
| Ethidiumbromid (Stammlösung) ➔ Sigma, E1510 | 10 mg / ml in nukleasefreiem aqua dest. |
| Mammalian Ringer (Na ⁺ -frei) | 130 mM Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) 4 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 20 mM Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES) 1 mM TMAPO ₄ 18 mM Glucose mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAOH) auf pH 7,4 eingestellt |
| Mammalian Ringer | 130 mM NaCl 4 mM KCl |

MATERIAL

| | |
|---|--|
| | 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 20 mM HEPES 1 mM TMAPO ₄ 18 mM Glucose mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt |
| Marker (Agarosegel-Elektrophorese) → Invitrogen, 15628-050 | 10 µl Marker 40 µl 5x Agarosegel-Elektrophorese- Ladepuffer 150 µl nucleasefreies aqua dest. |
| Marker (Agarosegel-Elektrophorese) → Fermentas, SM0321 | 100 µl Marker 100 µl 6x Ladepuffer (Fermentas, R0611) 400 µl nukleasefreies aqua dest. |
| Marker (Western Blot) → Fermentas, SM0671 | 250 µl Marker |
| Membranpuffer | 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 100 µl / 10ml Phenylmethylsulfonylfluorid 4 µl / 10 ml Aprotinin 4 µl / 10 ml Leupeptin |
| PBS (Posphat-gepufferte Salzlösung) → AppliChem, A0964 | 9,55 g in 1 l aqua dest. |
| SDS-PAGE Laufpuffer (10x) | 30,3 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt |
| SDS-PAGE Sammelgel Puffer | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS in aqua dest. |
| SDS-PAGE Trenngel Puffer | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS in aqua dest. |
| SDS-PAGE Ladepuffer | 5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % Glycerol (v/v) 1 % SDS 1 % β-Mercaptoethanol |
| TGF-β1-Pufferlösung | 50 mM Trishydroxymethylaminomethan- Azetat (Tris-Acetat) HCl 7,5 20 % (w/v) Glycerol 1 mM EDTA |
| Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 5x | 54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,5 aufgefüllt auf 1 l mit aqua dest. |
| Western-Blot-Puffer | 25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol |

3.6 Chemikalien

Die oben genannten Chemikalien wurden bezogen von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen,

Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). Das radioaktiv markierte Sulfat (^{35}S) stammt von der Firma Hartmann (Braunschweig, Deutschland). TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor – beta 1*, Katalognr.: 76861) wurde von der Firma biomol (Hamburg, Deutschland) bezogen.

3.7 Kits und Enzyme

| Kit/Enzym | Hersteller |
|-------------------------------|---|
| SV Total RNA Isolation System | Promega (Madison, WI, USA) Katalognr.: Z3100 |
| Taq-Polymerase | in eigener Arbeitsgruppe isoliert |

3.8 Geräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|-------------------|----------------------------|--|
| Blotphotographie | LAS 3000 Imager | Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland) |
| Brutschrank | Function Line BB16 | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Elektrophorese | EPS 3500 XL | Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| Feinwaage | 2002 MP1 | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Geldokumentation | Gel Print 2000 I | Biophotonics (Ann Arbor, MI, USA) |
| Gelkammer | Midi | Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) |
| Homogenisator | Labsonic 3000 | B. Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Hypoxie-Inkubator | INVIVO ₂ 400 | Ruskin Life Science (Pencoed, Großbritannien) |
| Magnetrührer | KM02 electronic | IKA Labor Technik (Staufen, Deutschland) |
| Mikroskop | Telaval 31 | Zeiss (Oberkochen, Deutschland) |
| Mikroskopkamera | PowerShot G2 | Casio (Tokio, Japan) |
| Mikrowelle | Privileg 8521 | Quelle Schickedanz (Fürth, Deutschland) |
| Minizentrifuge | C-1200 | Labnet International (Woodbridge, NJ, USA) |
| PCR Cycler | GeneAmp PCR System 2400 | Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) |
| | RoboCycler Gradient 96 | Stratagene (La Jolla, CA, USA) |

MATERIAL

| | | |
|--|----------------------------------|---|
| pH-Meter | CG820 | Schott (Mainz, Deutschland) |
| Photometer | Novaspec II | Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) |
| Pipettierhilfe | Pipetus Accu | Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland) |
| Proteinbestimmung | Mithras LB 940 | Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland) |
| Real-time PCR Cycler | Mx3005p | Stratagene (Waldbronn, Deutschland) |
| RNA / DNA Calculator und Photometer | GeneQuant II | Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) |
| Szintillationszähler | 1500 Tri-Carb | Packard Instrument (Meriden, CT, USA) |
| Ultrazentrifuge Rotor | OTD65B TFT6513 | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| UV Transilluminator | TM40 | UVP (Upland, CA, USA) |
| Vortex | MS1 | IKA (Staufen, Deutschland) |
| Waage | LC6215 | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Wasserbäder | D8 | Haake (Karlsruhe, Deutschland) |
| | 1083 | GFL (Burgwedel, Deutschland) |
| Werkbank (steril) | Microflow | Nunc (Langenselbold, Deutschland) |
| Western-Blot-Kammer | | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Western Blot Power Supply | ST606T | Gibco (Karlsruhe, Deutschland) |
| Zählkammer (nach Neubauer) | Hell-lining | Saaringia (Saarlouis, Deutschland) |
| Zentrifugen | Biofuge fresco Labofuge 400 R | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| | 5417R | Eppendorf |
| | 5415D | (Hamburg, Deutschland) |

3.9 Software

| Programm | Nutzung | Hersteller |
|----------------------|--|--|
| GraphPad Prism 5 | Statistische Überprüfung der Ergebnisse und Erstellung der Graphen | GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA) |
| Image J 1.44 | densitometrische Auswertung der Western Blots | National Institut of Health (Bethesda, MD, USA) |
| Microsoft Excel 2007 | Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse | Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA) |

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kulturmedium (TK-Medium)

Das Kulturmedium beinhaltete *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit niedrigem Glucoseanteil (1mg/ml), 200µl Glutamin, 10% *Fetal Calf Serum* (FCS) und Penicillin (100 U / ml Medium) / Streptomycin (100 µg / ml Medium). Die einzelnen Bestandteile lagen bereits steril filtriert vor und wurden dann nach dem Auftauen von -18°C bei Raumtemperatur in sterilen Laborglasgefäßen zusammengefügt und bei 4°C aufbewahrt.

4.1.2 Kultivierung

Die Zellen der beiden Linien TK173 und TK188 wurden in Petrischalen mit jeweils 10 ml des TK-Mediums ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Vor der Zugabe in die Schalen wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer unter einer Verdünnung von 1:10 gezählt und die Zellsuspension im Anschluss mit TK-Medium so verdünnt, dass pro Schale eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen der Linie TK173 und $3 \cdot 10^5$ Zellen der Linie TK188 ausgesät werden konnte. Die Ausgangsmengen der Zellen beruhen auf deren unterschiedlichen Wachstumstendenzen, die sich in Vorversuchen mit diesen Zelllinien herauskristallisierten. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage, eine mikroskopische Kontrolle des Konfluenzfortschritts erfolgte alle zwei Tage. Eine vollständige Konfluenz der Zellen war unter obigen Bedingungen nach etwa sechs Tagen erreicht.

4.1.3 Zellernte und Passagieren der Zellen

Nach Erreichen der vollständigen Konfluenz wurden die Zellen geerntet und entweder der RNS-Isolation zugeführt oder erneut ausgesät (passagiert). Den Zellen wurde dazu zunächst das Medium durch Absaugen entzogen und anschließend eine Menge von 6 ml PBS zum Spülen zugeführt. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und die Menge von 3 ml Trypsin 0,1% in PBS zugegeben. Die Petrischalen wurden dann mit dem Trypsin für etwa drei Minuten im Brutschrank

inkubiert, um den Ablösungsprozess des Trypsins durch Wärme zu unterstützen. Die Zellen ließen sich danach mit der Pipette aus den Petrischalen mit dem darin befindlichen Trypsin ablösen. Das Trypsin mit den darin gelösten Zellen wurde anschließend in ein Röhrchen gegeben, in das 3 ml des TK-Mediums vorgelegt wurden, um die Trypsin-Konzentration zu halbieren und die weitere Lyse der Zellen zu stoppen. Das Röhrchen wurde danach bei 1000 U/min für 5 Minuten bei 23°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das am Boden des Röhrchens gebildete Zellpellet wurde erneut resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension sind dann in einem Eppendorf-Gefäß mit 90 µl des TK-Mediums 1:10 verdünnt und wie oben beschrieben in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt und erneut ausgesät worden.

4.2 TGF-β1

Die TGF-β1-Lösung (biomol®) wurde von der Ausgangskonzentration von 0,1 mg Protein/ml um 1:1000 auf 1 ng Protein/µl mit TK-Medium verdünnt.

Nachdem die Zelllinien TK173 und TK188 nach etwa drei Tagen Inkubation in den Petrischalen subkonfluent ausgewachsen waren, wurde anschließend die TGF-β1-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (Tab. 4.1) zusammen mit frischem TK-Medium auf die Zellen gegeben. Die Konzentrationsgrößen zur Orientierung wurden aus Literaturvorgaben (STRUTZ et al. 2001) übernommen. Um einen Einfluss der Pufferlösung, in der die TGF-β1-Proteine gelöst waren, auszuschließen, wurde eine entsprechende Lösung mit 50mM Tris-Azetat, 1mM EDTA und 20% Glycerol mit Essigsäure auf einen pH von 7,5 titriert und zu der Kontrolle zugefügt.

| Zelllinie | TGF-β1 (ng/ml) |
|-----------|----------------|
| TK173 | - |
| TK173 | 0,1 |
| TK173 | 1,0 |
| TK173 | 10 |
| TK188 | - |
| TK188 | 0,1 |
| TK188 | 1,0 |
| TK188 | 10 |

Tab. 4.1 TGF-β1-Konzentrationen

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.3.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine Amplifikation destinkter DNS-Abschnitte, um diese im Anschluss aufgrund ihrer Menge an identischen Kopien nachweisen zu können. Für die Reaktion müssen neben dem originalen DNS-Abschnitt (*Template*), der vervielfältigt werden soll, zwei einzelsträngige Oligonukleotide (*Primer*) vorliegen, die durch Bindung an das Template den zu vervielfältigenden Bereich auf beiden Seiten begrenzen. Die Amplifikation des derart eingeschlossenen DNS-Abschnitts erfolgt durch eine hitzestabile DNS-Thermus-aquaticus-Polymerase (Taq-Polymerase) in 5' → 3' – Richtung. Hierbei werden in der Reaktionslösung befindliche Desoxyribonucleotid-Triphosphate als Bausteine verwendet. In einer vorher definierten Anzahl an Reaktionszyklen mit unterschiedlichen Temperaturniveaus (Tab. 4.2) wird die DNS durch Erhitzen zunächst denaturiert, durch Abkühlung werden im Folgenden die Primer an die Einzelstränge angelagert und schließlich durch die Taq-Polymerase elongiert. Pro Zyklus findet somit eine Verdoppelung der DNS-Kopien statt, deren Länge jedoch erst ab dem dritten Zyklus durch die Primer auf beiden Enden definiert ist und deren Anzahl mit den weiteren Amplifikationszyklen exponentiell ansteigt (Abb. 4.1).

Limitiert ist die Amplifikation durch einen Verbrauch der Reaktionskomponenten sowie eine Abnahme der Polymeraseaktivität. Eine weitere Produktamplifikation ist dann nicht möglich und die Reaktion erreicht eine Plateau-Phase. Eine sinnvolle Anzahl an Zyklen, nach denen eine ausreichende Produktmenge zur Verfügung steht, ist üblicherweise nach 20 – 45 Zyklen erreicht.

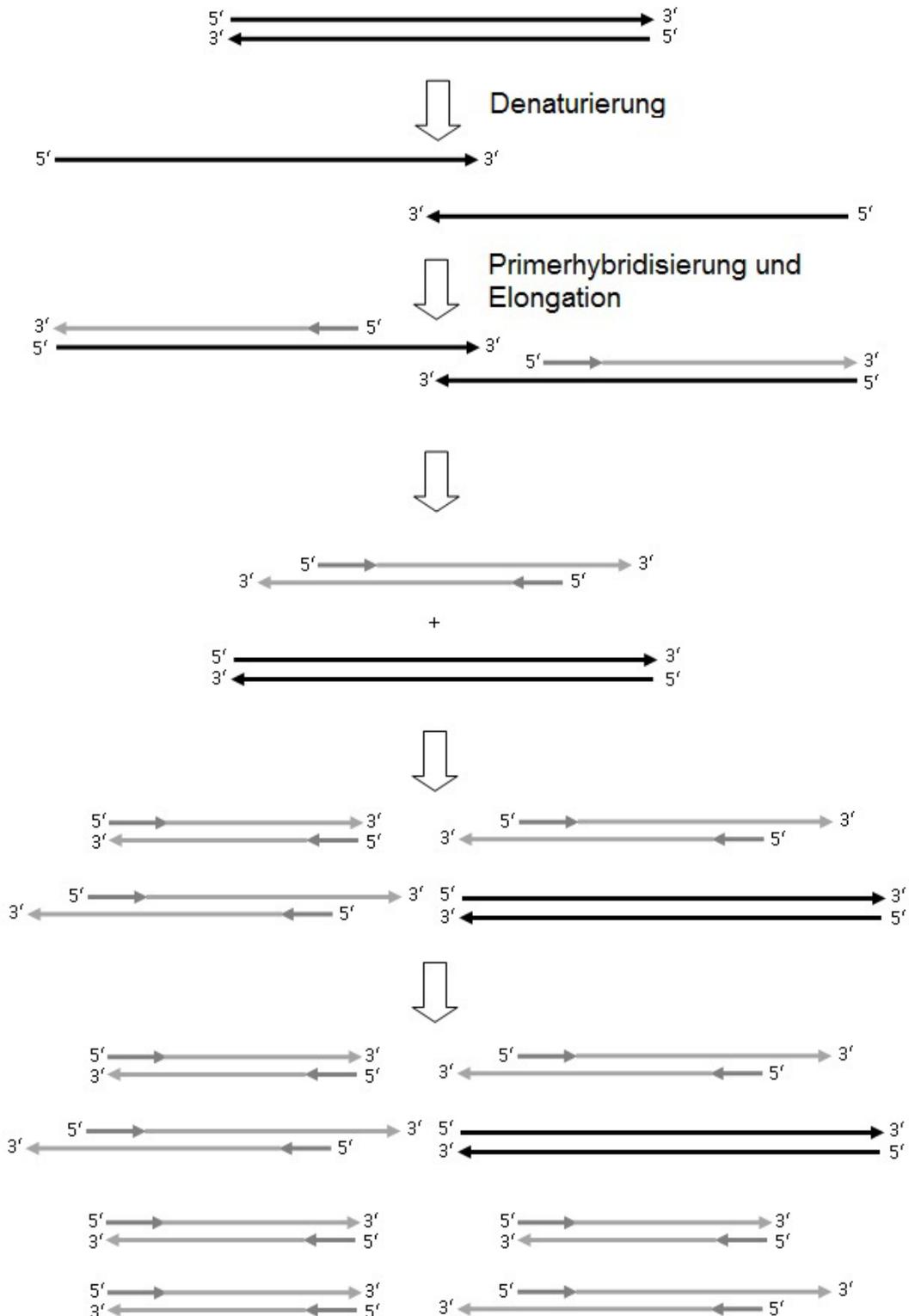


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der PCR. Dargestellt ist die Ausgangs-DNS (*Template*), die durch nachfolgende Denaturierung aufgetrennt und durch Anlagerung der Primer und anschließende Elongation durch Taq-Polymerase vervielfältigt wird. Die Menge des gewünschten Produkts steigt dabei exponentiell an (modifiziert nach RASSOW 2006, S. 493).

| Zeit | Temperatur | Prozess | Zyklen |
|--------|------------|---------------|-----------|
| 3 min | 94°C | Denaturierung | 1 Zyklus |
| 40 sek | 94°C | Denaturierung | |
| 50 sek | 58°C | Annealing | 25 Zyklen |
| 1 min | 72°C | Elongation | |
| 5 min | 72°C | Elongation | 1 Zyklus |

Tab. 4.2 Temperaturvorgaben und Zyklen für die PCR

Die notwendige cDNS wurde zunächst bei -18°C aufbewahrt und für den Versuch auf Eis aufgetaut. In einem 0,5 ml-Eppendorf-Gefäß wurden dann zu 5 µl der cDNS noch 45 µl des Mastermix (Tab. 4.3) pipettiert und anschließend nach dem Schema aus Tab. 4.2 im *Thermocycler* inkubiert.

| Reagenz | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| RNase-freies H ₂ O | 29 µl |
| dNTP (1,25 mM) | 8 µl |
| 10x Puffer (5 mM) | 5 µl |
| Taq-Polymerase | 1 µl |
| Forward-Primer (20 pM) | 1 µl |
| Reverse-Primer (20 pM) | 1 µl |

Tab. 4.3 Mastermix für die PCR

Zur Bestimmung von CDH1 (E-Cadherin), SLC13A1 (NaS_i-1), SLC26A1 (SAT-1) und ACTA2 (alpha-sma) wurden die unter 3.1 genannten Primer verwendet. Eine Negativkontrolle wurde in jedem Ansatz mitgeführt.

Nach erfolgter Amplifikation wurden die Proben mit einer 100bp-DNS-Leiter sowie einer Negativkontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. An der Größe des PCR-Produkts orientiert, wurden für CDH1 und alpha-sma 1,5%ige, für NaS_i-1 und SAT-1 2%ige Agarose-Gele eingesetzt.

4.3.2 Isolierung und Aufreinigung der RNS

Isolierung und Aufreinigung mit TRIzol® (Invitrogen, USA)

Die Isolierung der RNS aus beiden Zelllinien erfolgte zunächst über die TRIzol-Methode, welche sich jedoch im Nachhinein als eher ungünstig für diese beiden Zelllinien herausstellte, da sich hiermit nur sehr geringe Mengen RNS generieren ließen, die zudem auch noch verhältnismäßig unrein waren.

Zunächst wurde aus den 6-Well-Platten das Medium durch Absaugen entfernt und die Platten mit den verbleibenden Zellen anschließend auf Eis gelegt. Danach wurde pro Well 1 ml TRIzol® zugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mithilfe einer Eppendorf-Pipette spülend vom Boden des Wells gelöst und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, in welches zuvor 0,2 ml Chloroform gegeben wurden. Im Anschluss wurde das Gefäß für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gefäß kräftig geschüttelt und bei 12000 U/min und 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die oberste, circa 600 µl große Phase in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, in das zuvor 0,5 ml Isopropanol gegeben worden waren. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 20 min bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand komplett abpipettiert und das gelartige Pellet am Boden des Gefäßes belassen. Auf das Pellet wurde dann 1 ml 75%iges Äthanol gegeben, um das Pellet vom Boden zu lösen. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 7500 U/min und 4°C, wurde der Überstand erneut komplett abpipettiert und nach 5 - 10 Minuten Trocknungszeit bei Raumtemperatur das Pellet in 20 µl H₂O gelöst.

Isolierung mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega, USA)

Aufgrund der unbefriedigenden Resultate bei der RNS-Isolierung mit TRIzol® wurde das SV Total RNA Isolation System verwendet, mit welchem verlässlichere Ergebnisse und qualitativ hochwertigere RNS erreicht werden konnten. Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR wurden daher mit RNS aus dieser Methode generiert. Die Isolierung erfolgte gemäß dem beigefügten *Spin Protocol* der Firma Promega, nachdem bereits zuvor die mitgelieferten Reagenzien nach Herstelleranleitung vorbereitet worden waren:

Die inkubierten Zellen wurden aus den Kulturschalen entsprechend des in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Verfahrens abgelöst, zentrifugiert und ausgezählt, so dass eine Anzahl von $5 \cdot 10^6$ Zellen für die RNS-Isolierung zur Verfügung stand. Alle folgenden Schritte wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt. In einem Eppendorf-Gefäß wurden auf die Zellen 200 μ l des *RNA Lysis Buffers* gegeben und anschließend das Gefäß kräftig geschwenkt. Anschließend wurden 350 μ l des *RNA Dilution Buffers* zu der Suspension zugefügt und erneut geschwenkt. Das Gefäß wurde anschließend bei 70°C für 3 min in einem Wasserbad erhitzt und danach bei 10 000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde danach in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 200 μ l 95%iger Äthanol zugegeben. Der komplette Inhalt wurde anschließend in die mitgelieferte *Spin Basket Assembly* gegeben, welche dann für 1 min zentrifugiert wurde. Die im Eppendorf-Gefäß abfiltrierte Flüssigkeit wurde im Anschluss verworfen und dann 600 μ l der *RNA Wash Solution* auf die Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Die abfiltrierte Flüssigkeit wurde erneut verworfen und in das Körbchen 50 μ l des *DNase Incubation Mix* (40 μ l *Yellow Core Buffer*, 5 μ l $MnCl_2$ 0,09 M und 5 μ l DNase I) gegeben. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurden 200 μ l der *DNase Stop Solution* in das Körbchen hinzugegeben und anschließend für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit zunächst 600 μ l der *RNA Wash Solution* und anschließendem Zentrifugieren für 1 Minute und dann noch einmal mit 250 μ l der *RNA Wash Solution* und 2-minütiger Zentrifugation. Das Körbchen wurde dann in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und, entgegen dem Protokoll des Herstellers, der 100 μ l empfiehlt, wurden 30 μ l Nuklease-freien Wassers in das Körbchen gegeben und für 1 min erneut zentrifugiert. Eine Reduktion der Wassermenge war erforderlich, um ausreichende Konzentrationen an RNS zu erhalten. Versuche, die Konzentration der RNS durch Eindampfen zu erhöhen, hatten einen nicht unerheblichen Qualitätsverlust der RNS zur Folge, weswegen hiervon Abstand genommen wurde. Die gewonnene RNS wurde im Anschluss direkt photometrisch auf Menge und Reinheit geprüft und entweder bei -70°C tiefgefroren oder direkt weiterverwendet.

4.3.3 Reverse Transkription

Die aufgereinigte RNS wurde im Anschluss mithilfe einer reversen Transkriptase in die entsprechende cDNS umgeschrieben. Hierfür wurden 2,5 μ g RNS mit RNase-

freiem H₂O in ein 0,5 ml-Eppendorf-Gefäß auf 7 µl aufgefüllt und 1 µl Oligo dT zugefügt. Anschließend wurde der Inhalt des Eppendorf-Gefäßes im Thermoblock denaturiert (Tab. 4.4).

| Zeit | Temperatur | Prozess |
|-------------|------------|-------------------------|
| 10 min | 70°C | Denaturierung |
| <i>Hold</i> | 4°C | Abstoppen des Prozesses |

Tab. 4.4 Temperaturvorgaben für die RNS-Denaturierung

Anschließend wurden zu der Probe 12 µl des Mastermix (Tab. 4.5) hinzugegeben. Die Negativ-Kontrollen enthielten statt der RNS RNase-freies H₂O und wurden zusammen mit den anderen Proben im Thermoblock inkubiert (Tab. 4.6).

| Reagenz | Volumen |
|-------------------------------------|---------|
| 5x Puffer | 4 µl |
| M-MuLV-Transkriptase (200 Units/ml) | 1 µl |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl |
| RNAse-freies H ₂ O | 6 µl |

Tab. 4.5 Mastermix für die cDNS-Umschreibung

| Zeit | Temperatur | Prozess |
|-------------|------------|-------------------------|
| 60 min | 37°C | Denaturierung |
| 10 min | 70°C | Amplifikation |
| <i>Hold</i> | 4°C | Abstoppen des Prozesses |

Tab. 4.6 Temperaturvorgaben für die cDNS-Transkription

Im Anschluss wurden die Proben entweder bei -20°C tiefgefroren oder direkt weiterverwendet.

4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR)

4.4.1 Prinzip

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) (HEID et al. 1996) folgt dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, ermöglicht jedoch zusätzlich eine verlässliche quantitative Bestimmung des entstandenen Produkts. Diese Methode hat sich zwischenzeitlich zu einem Standard in der quantitativen Messung von Nukleinsäuren entwickelt (OVERBERGH et al. 2003). Die Bestimmung erfolgt mithilfe von Fluoreszenz-markierten Sonden, bestehend aus Basensequenzen, die jeweils komplementär zu den zu bestimmenden Zielsequenzen sind. Anhand der Änderung der Fluoreszenz kann dann bei permanenter Messung während bzw. am Ende eines Amplifikationszyklus eine Zunahme des Produkts nachgewiesen werden (HIGUCHI et al. 1993; FINK et al. 2000). Eine relative Quantifizierung des zu untersuchenden Produkts erfolgte in diesem Fall über den Vergleich mit der Produktmenge eines nicht-regulierten Gens (*housekeeping gene*: GAPDH) (RASMUSSEN 2001). Als Größe für die Quantifizierung dient dabei der Ct-Wert, der den Zyklus markiert, an dem ein bestimmtes Fluoreszenzniveau (*threshold*) über dem Hintergrundsignal (*baseline*) erfasst wird. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden hierbei ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin) als passive Messwertreferenz, um die Proben gegeneinander abzugleichen, sowie TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und FAM (6-Carboxy-Fluorescein) benutzt. Die sogenannten TaqMan[®]-Proben sind Sonden, deren 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM und deren 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff TAMRA besetzt sind. Zusätzlich enthält die Reagenz spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer für die jeweils zu amplifizierende Sequenz. Die Sonde löscht bei intakter Struktur ihr eigenes Signal nahezu aus, indem der Quencher TAMRA eine Extinktion bei etwa 545 nm zeigt, während der Emissionsbereich von FAM in etwa diesem Bereich liegt. Die Auslöschung des Signals beruht dabei auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer.

Im Verlauf der PCR bindet die Sonde in der Annealing-Phase ihre komplementäre DNS-Sequenz zwischen den beiden Primer-Bindungsstellen. Die Taq-Polymerase verlängert, wie bei jeder PCR, die Primer in 3'-Richtung bis sie in diesem Fall auf die Sonde treffen. Diese wird durch die Polymerase vom DNS-Strang abgelöst und durch Hydrolyse gespalten. In der Folge verliert der Quencher aufgrund der

räumlichen Trennung von Sonde und Quencher seine signalhemmende Funktion und das FAM-Signal kann detektiert werden.

4.4.2 Durchführung

Die Versuche wurden mit dem LightCycler MX3005P der Firma Stratagene durchgeführt. Dazu wurden in 96-Well-Platten zu 2,5 µl der cDNS 22,5 µl des Mastermix (Tab. 4.7) gegeben und im *Cycler* mit 47 Zyklen (Tab. 4.8) inkubiert.

| Reagenz | Volumen |
|--------------------------------|---------|
| 2x qrt-Puffer und TaqMan Probe | 12,5 µl |
| Primer (vorwärts/rückwärts) | 1,25 µl |
| RNAse-freies H ₂ O | 8,75 µl |

Tab. 4.7 Mastermix für die *real-time* PCR (qrtPCR)

| Zeit | Temperatur | Prozess | Zyklen |
|--------|------------|--------------------------------|-----------|
| 2 min | 50°C | Denaturierung | 1 Zyklus |
| 10 min | 95°C | Aktivierung der Taq-Polymerase | |
| 15 sek | 95°C | Denaturierung | 47 Zyklen |
| 1 min | 60°C | Annealing/Elongation | |

Tab. 4.8 Temperaturvorgaben und Zyklen für die qrtPCR

Die Messung erfolgte automatisch durch die MxProTM-Software der Firma Stratagene. Die relative Quantifizierung wurde anhand der Ct-Werte des zu bestimmenden Abschnitts gegenüber GAPDH nach folgender Formel durchgeführt und das Ergebnis als Zyklendifferenz ausgedrückt:

$$\Delta Ct = Ct_Z - Ct_R$$

ΔCt : Zyklendifferenz

Ct_Z : Ct-Wert des Zielgens

Ct_R : Ct-Wert des Referenzgens

4.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese ist es möglich, DNS-Moleküle entlang eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wandert die negativ geladene DNS durch eine Gelmatrix zur Anode des elektrischen Feldes. Entscheidend für die Wanderungsgeschwindigkeit der DNS sind die Porengröße der Gelmatrix, die Größe der DNS-Moleküle und die angelegte Spannung. Folglich werden größere DNS-Moleküle wesentlich langsamer durch das Gel diffundieren als kleinere. Außerdem reduziert eine höhere Agarose-Konzentration die Wanderungsgeschwindigkeit, wodurch eine bessere Auftrennbarkeit von kleineren Molekülen erreicht werden kann. Als Marker für die DNS-Banden dient Ethidiumbromid, welches dem Gel zugegeben und durch Interkalierung der DNS unter UV-Licht sichtbar wird.

Im konkreten Fall wurde zunächst je nach Größe der zu erwartenden Banden 1,5%iges (GAPDH, E-CDH) bzw. 2%iges (NaSi-1, SAT-1) Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1,5 g bzw. 2,0 g Agarose in 100 ml des 0,5x TBE-Puffers aufgelöst und anschließend in einer Mikrowelle kurz aufgeköcht. Dieser Vorgang wurde ggf. wiederholt, wenn die Agarose nach dem ersten Kochen noch nicht vollständig aufgelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurden 3 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) zugefügt und durch Schwenken ausreichend verteilt. Die Agarose-Lösung wurde dann in die Gelkammer überführt und der Kamm zum Erzeugen der Geltaschen eingesetzt. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Gels, wurde der Kamm entfernt und 20 µl der jeweils zu testenden Probe mit 5 µl des Ladepuffers vermischt und anschließend in die Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl der 100bp-DNS-Leiter als Referenz in die erste Tasche pipettiert, um die entstehenden DNS-Banden zuordnen zu können. Die Kammer und die Elektroden wurden mit 5x TBE-Puffer benetzt und die Elektrophorese mit 100 V für ca. 65 min durchgeführt. Das Gel wurde im Anschluss unter UV-Durchleuchtung photographiert.

4.6 Hypoxie

Für die Versuche unter Hypoxiebedingungen wurden die subkonfluent ausgewachsenen Zelllinien in Petrischalen in den Hypoxie-Inkubator verbracht und dort bei 1% Luftsauerstoff und 99% Stickstoff für jeweils 2, 4, 6, 9, 12 und 24

Stunden inkubiert. Parallel hierzu wurden ebenfalls Petrischalen beider Zelllinien in einem zweiten Inkubator zu gleichen Zeiten unter 21% Luftsauerstoff und 79% Stickstoff als Kontrollgruppe inkubiert. Für beide Inkubatoren wurden eine Temperatur von 37 °C eingestellt. Die Zellernte und Isolierung der RNS fand bei den Zellen unter Hypoxie im Hypoxie-Brutschrank statt, so dass ein Einfluss von Sauerstoff während der RNS-Isolierung ausgeschlossen werden konnte.

4.7 Isolierung der Zellmembranproteine

Die Zellen wurden nach Ende der Inkubationsdauer in 6-Well-Platten auf 4°C abgekühlt und zweifach mit eiskaltem PBS gewaschen. In jedes Well wurden anschließend 0,5 ml des Membranpuffers gegeben. Die Zellen konnten im Anschluss abgeschabt und in gekühlte Inkubationsgefäße gegeben und dort homogenisiert werden. Das Zelllysate wurde anschließend bei 13 000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand im Anschluss abgenommen und erneut für 30 min bei näherungsweise 100 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befand sich dann das Zytosol, während die Zellmembran als Pellet ausfiel. Das Pellet wurde dann mit eiskaltem Membranpuffer gewaschen und anschließend in 1x SDS Ladepuffer gelöst. Zum Überstand wurde ein Viertel seines Volumens an 5x SDS Ladepuffer gegeben.

4.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Vor Beladen des Gels ist es erforderlich, die Proteinmenge in der Probe zu kennen, um ein gleichmäßiges Beladen des Gels zu erreichen. Dazu wurden die Proteinlösungen zunächst 1:4 mit aqua dest. verdünnt. Zu 20 µl dieser Proteinlösung wurden dann 200 µl Bradford-Lösung gegeben. Anschließend wurde die Probenlösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Extinktion mithilfe des *multimode microplate readers* Mithras LB 940 gemessen und mittels zugehöriger Software ausgewertet. Als Leerwert diente dabei eine äquivalente Lösung, die statt der 20 µl Proteinlösung 20 µl aqua dest. enthielt.

4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse. Im Gegensatz zu einer normalen Agarose-Gelelektrophorese werden die Faktoren Größe, Ladung und Form der Proteine durch eine Vorbehandlung des Proteingemisches mit Natrium-Lauroylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) nivelliert. SDS fungiert als Detergens mit stark amphiphatischen Eigenschaften und verleiht der entfalteten Peptidkette der Proteine eine stark negative Ladung. Um die Denaturierung der Proteine zu vervollständigen, wird Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Hierdurch werden die Disulfid-Brücken im Protein gespalten.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde zunächst ein Sammelgel auf ein Trenngel (Tab. 4.9) gegeben und die Taschen dieses sogenannten diskontinuierlichen Gels dann mit 15 μ g des entsprechenden Membranproteins beladen, welches zuvor in SDS-Ladepuffer für 10 min bei 95°C erhitzt und mit Bromphenolblau gefärbt wurde. Die erste Tasche des Gels wurde mit einem Molekulargewichtsmarker beladen. Im Anschluss wurde die Gelelektrophorese im SDS-PAGE-Laufpuffer bei 10 mA durchgeführt, bis die Proben vom Sammel- in das Trenngel übergetreten waren. Anschließend wurde die Gelelektrophorese für 180 min bei 20 mA durchgeführt.

| Reagenz | Trenngel 10% | Sammelgel 4% |
|---|--------------|--------------|
| 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid | 333 μ l | 2,97 ml |
| H ₂ O (aqua dest.) | 1,52 ml | 3,78 ml |
| Sammel- / Trenngelpuffer (4x + 0,4 % SDS) | 0,625 ml | 2,25 ml |
| Tetramethylethyldiamin | 2,5 μ l | 4,5 μ l |
| Ammoniumpersulfat | 12,5 μ l | 45 μ l |

Tab. 4.9 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

4.10 Western Blot

Mithilfe des Western Blots ist es möglich, bestimmte Proteine nachzuweisen und die Größe dieses Proteins zu bestimmen. Hierbei wird ein primärer Antikörper verwendet, der an das zu bestimmende Protein bindet. Ein zweiter, sekundärer Antikörper wiederum bindet dann an den F_c-Teil des primären Antikörpers. Der sekundäre Antikörper ist zusätzlich mit einem Enzym konjugiert, das unter Zugabe seines spezifischen Substrats eine Reaktion katalysiert, an deren Ende eine Lichtemission steht, die man mithilfe röntgenologischer Verfahren nachweisen kann.

4.10.1 Proteintransfer auf die PVDF – Membran

Zunächst wurde eine PDVF-Membran zugeschnitten, kurz in Methanol getaucht, mit aqua dest. gewaschen und in den Western Blot Puffer gelegt. Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese äquilibriert und anschließend zusammen mit der aktivierten Membran zwischen Faserpads, die zuvor mit Western-Blot-Puffer getränkt wurden, sowie Filterpapier gelegt. Dieses Membran-Gel-Paket wurde im Anschluss in einen Kassettenhalter eingespannt und dieser in die Western-Blot-Kammer gesetzt. Die Kammer wurde daraufhin mit Western-Blot-Puffer gefüllt und eine Elektrophorese für 1 Stunde bei 100 V durchgeführt.

4.10.2 Proteinnachweis auf den Western Blots

Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran zunächst mit PBS gewaschen, um auf diese Weise das verbliebene Methanol zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Stunde in 5 %iger Magermilch inkubiert, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Nachfolgend konnten die primären Antikörper gegen SAT-1 (Antikörper gegen NaS_r-1 waren zum Versuchszeitpunkt kommerziell nicht erhältlich) bzw. β -Aktin, was in diesem Fall das *housekeeping gene* darstellte, in einer Verdünnung von 1 : 1 000 in 5 %iger Magermilch auf die Membran gegeben werden. Die gesamte Membran wurde mit 1 ml dieser Lösung bedeckt. Im Anschluss wurde die Kammer versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran drei Mal im Abstand von je 15 min mit PBS (+ 0,05 % Tween 20) gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden dann in einer Verdünnung von 1 : 1 000 bzw. 1:10 000 in 5 %iger Magermilch auf die Membran

gegeben und nach 2-stündiger Inkubation erneut drei Mal im Abstand von je 15 min mit PBS (+ 0,05 % Tween 20) gewaschen. Zur Detektion wurden 10 ml ECL-Lösung auf die Membran gegeben und die Membran anschließend 5 min inkubiert. Die Auswertung des Blots erfolgte mit dem LAS3000 Imager.

4.11 Transport von [³⁵S]Sulfat

Die Zellen wurden nach Ende der Inkubation zunächst zwei Mal mit 37°C warmem PBS gewaschen und anschließend zwei Mal mit Natrium- und Sulfat-freiem *Mammalian* Ringer gewaschen. Das dann zugegebene Aufnahmemedium *Mammalian* Ringer enthielt zum Testen und Unterscheiden der beiden Transporter SAT-1 und NaS₁-1 im ersten Testansatz Natrium als notwendiges Substrat des Transporters NaS₁-1, der zweite Ansatz war Natrium-frei, um eine Aufnahme von Sulfat über den NaS₁-1 zu inhibieren. Sulfat kann im Gegensatz dazu jedoch unter beiden Ansätzen über SAT-1 in die Zellen aufgenommen werden, da Natrium kein notwendiges Substrat für den Sulfat / Anionen-Tauscher SAT-1 darstellt. Der dritte Ansatz war ebenfalls Natrium-frei, enthielt jedoch zusätzlich 0,1 mM DIDS, das als Hemmstoff für SAT-1 fungiert (MARKOVICH et al. 1994; REGEER et al. 2003). Auf diese Weise wurden sowohl SAT-1 als auch NaS₁-1 ausgeschaltet, um eine eventuell von diesen beiden Transportern unabhängige Sulfataufnahme erkennen zu können. Als Substrat zur Messung wurde in allen Ansätzen neben 50 µM Sulfat eine Menge von 0,01 µM [³⁵S]Sulfat, also radioaktiv markiertes Sulfat, zugefügt, das von beiden Transportern im Cotransport (NaS₁-1) bzw. Austausch (SAT-1) in die Zelle transportiert wird.

Nach 5-minütiger Inkubationsdauer wurde der Transport durch Absaugen des Aufnahmemediums und 3-maliges Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 500 µl 1 M NaOH für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (150 min⁻¹), um die Zellen aufzulösen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung durch Zugabe von 500 µl 1 M HCl neutralisiert und die Zelllösung in Szintillationsröhrchen überführt. 50 µl der Zelllösung wurden für den Bradford-Test verwendet. Im Anschluss wurden zur verbliebenen Zelllösung 2,5 ml Lumasafe Szintillationsflüssigkeit gegeben und der Gehalt des radioaktiv markierten [³⁵S]Sulfats im Szintillationszähler bestimmt.

| Aufnahmemedium | Natrium-haltig | Natrium-frei | Natrium-frei / 0,1 mM DIDS-haltig |
|---------------------|----------------|--------------|-----------------------------------|
| SAT-1 | aktiv | aktiv | inaktiv |
| NaS _r -1 | aktiv | inaktiv | inaktiv |

Tab. 4.10 Auswirkung der Aufnahmemedien auf die Funktion der Transporter

4.12 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Die statistischen Unterschiede zwischen zwei Gruppen, wurden über den ungepaarten t-Test nach Student ermittelt. Bei Vorhandensein von mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Methode verwendet. Die Unterschiede wurden als signifikant angenommen, wenn der Wahrscheinlichkeitswert $p \leq 0,05$ war. Es ist jeweils das arithmetische Mittel (*mean*) \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Zellwachstum und -form

Die beiden untersuchten Zelllinien unterscheiden sich bereits äußerlich durch ihr Aussehen sowie ihre Wachstumstendenz. Während die Zellen der Linie TK173 eher länglich polygonal mit rundlichem Zelleib in lockeren Zellverbänden wachsen, zeigen die Zellen der Linie TK188 teilweise sehr enge Zellverbände auf, die dann jeweils als Zellverband nach längerer Inkubation „Vakuolen“ bilden. Die Form der Zellen der Linie TK188 ist ebenfalls unterschiedlich zu TK173, denn TK188 wächst mit schmalem Zelleib und langen Ausläufern.

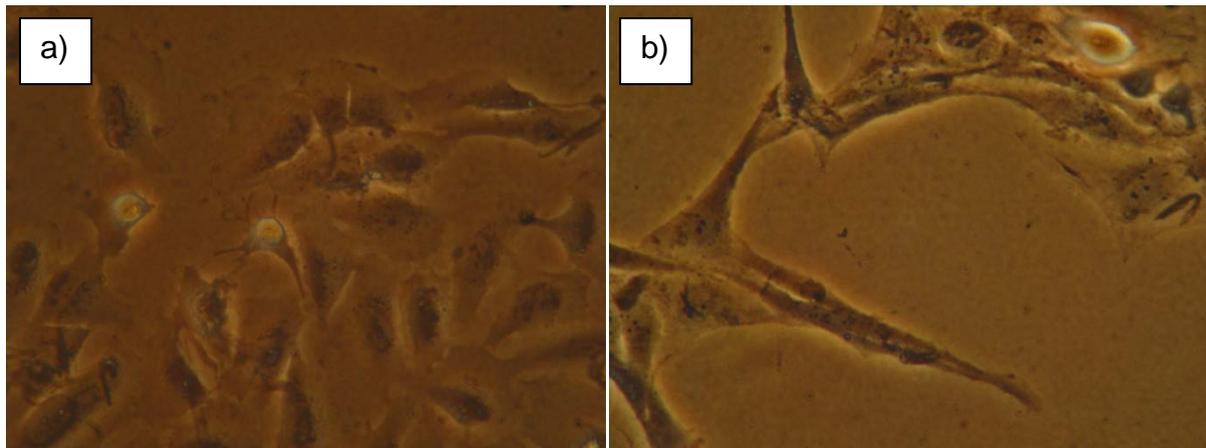


Abb. 5.1 Photographische Aufnahmen von a) Zelllinie TK173 und b) Zelllinie TK188 nach 3-tägigem Wachstum unter normoxischen Bedingungen in *low-glucose*-Zellmedium.

5.2 Nachweis von spezifischer mRNA in den Zelllinien TK173 und TK188

Bevor eine quantitative Auswertung der Transporter SAT-1 und NaSi-1, sowie des Bindeproteins E-CDH erfolgen konnte, schien es sinnvoll, die mRNA dieser Proteine zunächst über eine rtPCR nachzuweisen. Um einen ersten Eindruck von dem Einfluss des TGF- β 1 zu bekommen, wurde der Nachweis der mRNA direkt mit einem parallelen Zellansatz unter Zugabe von 1,0 ng / ml TGF- β 1 kombiniert.

5.2.1 Nachweis von SAT-1-mRNS

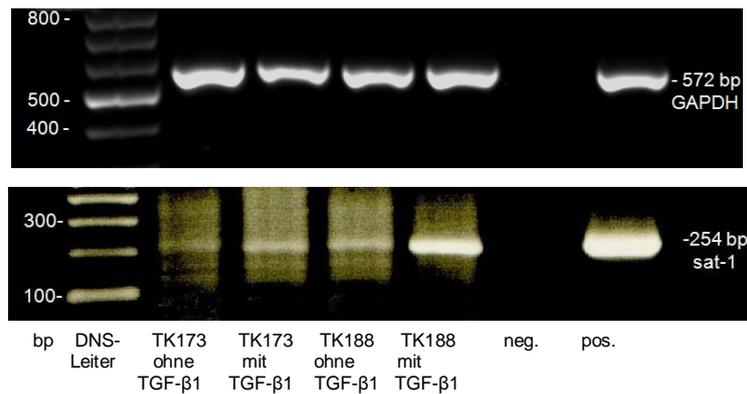


Abb. 5.2 Nachweis von GAPDH und SAT-1 (SLC26A1) in den Zelllinien TK173 und TK188 mit und ohne Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF-β1 für 3 Tage. Repräsentatives Experiment aus einer Serie von 3 Versuchen.

Die dargestellten Banden zeigen das Vorhandensein der mRNA von SAT-1 in beiden Zelllinien deutlich an. Die Höhe der Banden für SAT-1 stimmt näherungsweise mit der errechneten Größe von 254 bp für das PCR-Produkt der verwendeten Primer für SAT-1 überein. Im Vergleich zum Zellansatz, der mit 1,0 ng/ml TGF-β1 inkubiert wurde, lässt sich in beiden Zelllinien eine Steigerung der mRNA-Menge unter TGF-β1-Inkubation erkennen, wobei die „fibrotische“ Zelllinie TK188 sowohl unter TGF-β1 als auch ohne TGF-β1 eine stärkere Expression von SAT-1-mRNA zu haben scheint. Ein Nachweis über die quantitative *real-time* PCR kann hier Aufschluss bringen.

5.2.2 Nachweis von NaSi-1-mRNS

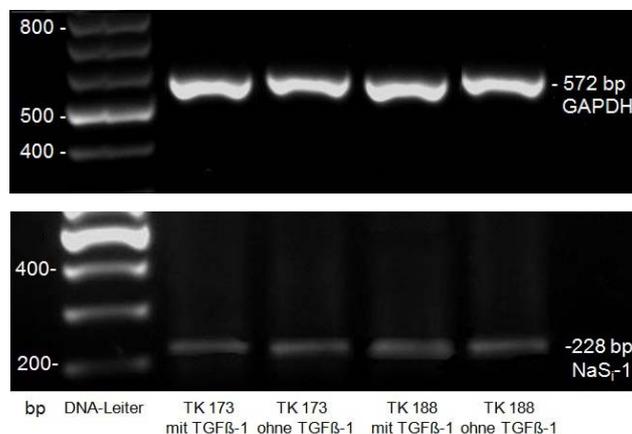


Abb. 5.3 Nachweis von GAPDH und NaSi-1 (SLC13A1) in den Zelllinien TK173 und TK188 mit und ohne Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF-β1 für 3 Tage. Repräsentatives Experiment aus einer Serie von 3 Versuchen (Beachte: Im Vergleich zur Abb. 5.1. sind die Ansätze mit und ohne TGF-β1 getauscht).

Die dargestellten Banden zeigen ein Vorhandensein des NaSi-1-Transporters in beiden Zelllinien an. Die Höhe der Banden für NaSi-1 stimmt näherungsweise mit der errechneten Größe von 228 bp für das PCR-Produkt der verwendeten Primer für NaSi-1 überein. Ein Unterschied zwischen den Zellen, die mit TGF- β 1 inkubiert wurden und den Kontrollzellen lässt sich aus dieser Darstellung nicht unbedingt ableiten. Jedoch scheint ein quantitativer Nachweis über eine *real-time* PCR hier zur exakten Bestimmung nötig zu sein.

5.2.3 Nachweis von E-Cadherin-mRNS

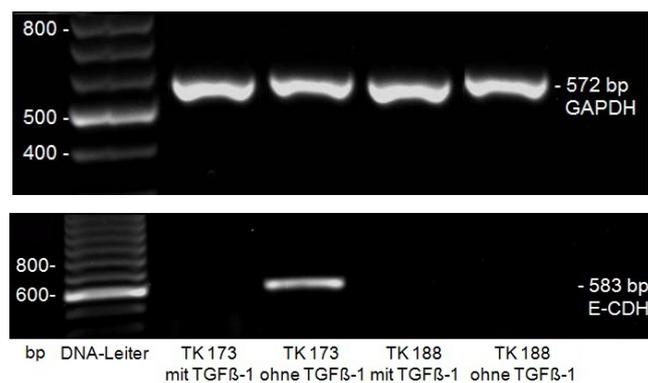


Abb. 5.4 Nachweis von GAPDH und E-Cadherin (CDH1) in den Zelllinien TK173 und TK188 mit und ohne Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage. Repräsentatives Experiment aus einer Serie von 3 Versuchen. (Beachte: Im Vergleich zur Abb. 5.1. sind die Ansätze mit und ohne TGF- β 1 getauscht).

Die dargestellten Banden zeigen ein Vorhandensein des E-Cadherins zunächst nur in der Zelllinie TK173 an. Die Höhe der Banden für E-Cadherin stimmt näherungsweise mit der errechneten Größe von 583 bp für das PCR-Produkt der verwendeten Primer für E-Cadherin überein. Es scheint so, als wäre die Expression von E-Cadherin in der Zelllinie TK173 zumindest auf mRNA-Ebene durch TGF- β 1 zu beeinflussen. Ein Vorhandensein von E-Cadherin in den Zellen der fibrotischen Zelllinie TK188 ist hier zunächst nicht erkennbar. Jedoch scheint ein quantitativer Nachweis in der *real-time* PCR für beide Zelllinien durchaus sinnvoll.

5.2.4 Nachweis von alpha-glattes-Gefäßmuskelaktin-mRNS

Ein Nachweis von α -sma konnte mit dem verwendeten Primer wiederholt nicht geführt werden. Da jedoch in den verwendeten Zelllinien bereits durch andere Arbeitsgruppen (HEEG et al. 2005) α -sma nachgewiesen werden konnte, wurden auch für α -sma *real-time* PCR-Messungen mit spezifischen Primern durchgeführt,

um ein Vorhandensein bzw. einen eventuellen Effekt von TGF- β 1 und Hypoxie auf das Protein zu untersuchen.

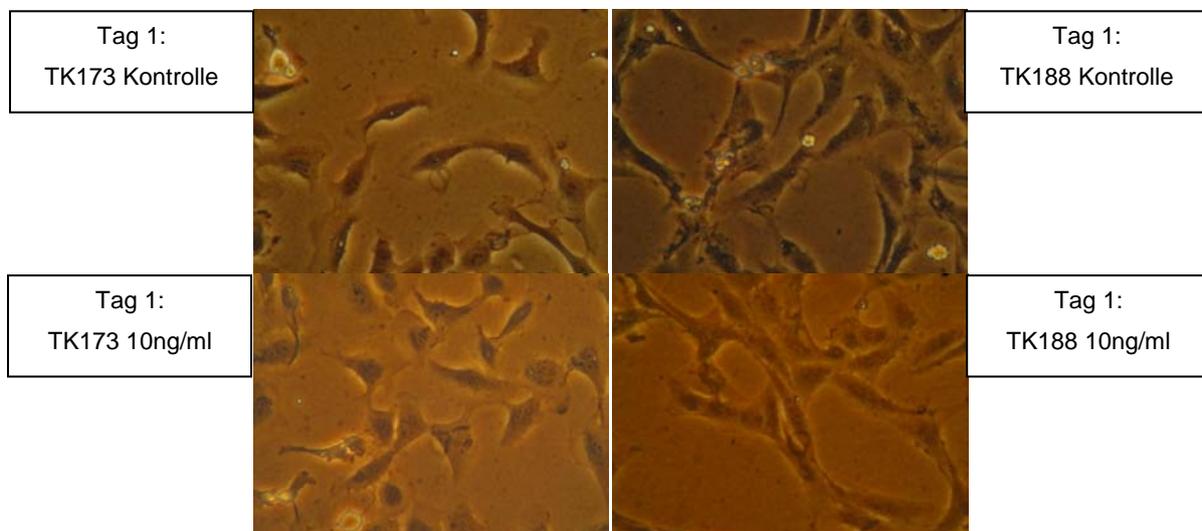
5.3 Einfluss von TGF- β 1 auf die Zelllinien TK173 und TK188

Um den Einfluss von TGF- β 1 zu untersuchen, wurden beide Zelllinien jeweils für 3 Tage mit TGF- β 1 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1) bei Luftsauerstoff und 37,0°C im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mitgeführt, die keinerlei TGF- β 1, jedoch den Puffer enthielt, in dem TGF- β 1 gelöst war, um eventuelle Einflüsse des Puffers zu nivellieren. Nach Ende der Inkubation erfolgte dann ein quantitativer Nachweis der mRNA über eine *real-time* PCR-Messung.

Bei den nachfolgenden Darstellungen gilt es zu beachten, dass es sich bei der Auftragung um Zyklendifferenzen Δ Ct (*cycle threshold*) handelt (Formel 4.1): Hohe Zyklendifferenzen stehen für niedrige mRNA-Mengen, während niedrige Zyklendifferenzen hohe mRNA-Mengen anzeigen.

5.3.1 Einfluss von TGF- β 1 auf das Zellwachstum

Zur Kontrolle des Einflusses von TGF- β 1 auf die Morphologie der Zellen der Linien TK173 und TK188, wurden die Zellen jeweils unter Kontrollbedingungen und unter Zugabe von 10 ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage inkubiert und photographisch kontrolliert.



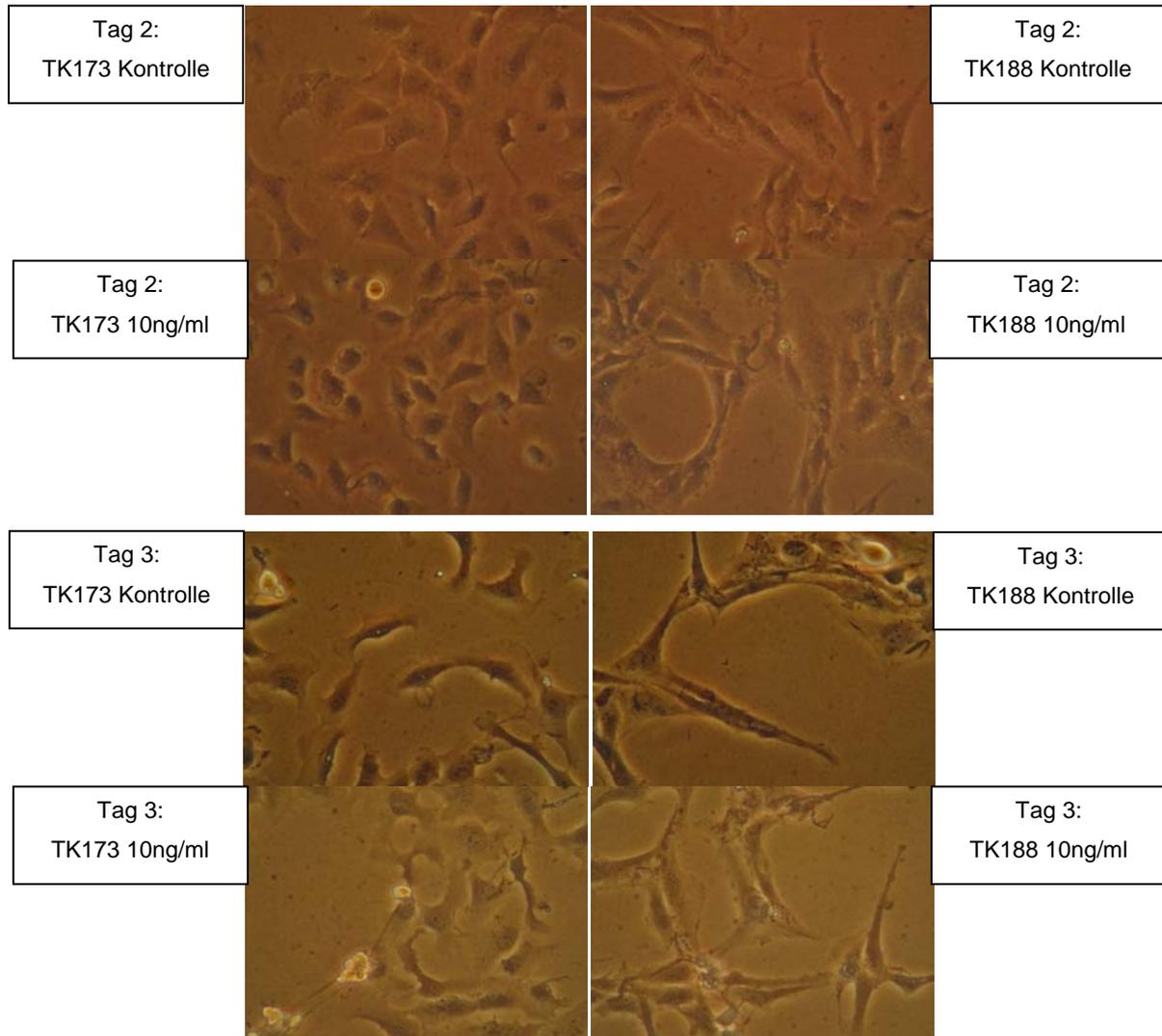


Abb. 5.5 Photographische Aufnahmen der Zelllinien TK173 und TK188 in An- und Abwesenheit von TGF- β 1. Die Zelllinien wurden jeweils in Abwesenheit und in Anwesenheit von 10ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage inkubiert und täglich photographiert. In der linken Spalte sind die Zellen der Linie TK173, in der rechten die der Linie TK188 dargestellt. Dabei sind für den jeweiligen Tag die Kontrolle und die TGF- β 1 – inkubierte Passage einer Zelllinie untereinander dargestellt.

Während sich an Tag 1 und 2 die Zellen der Linie TK173 unter TGF- β 1–Inkubation morphologisch zur Kontrolle kaum unterscheiden, könnte man am 3. Tag unter TGF- β 1 eine leichte Tendenz zur morphologischen Veränderung vermuten. Die Zellausläufer nehmen leicht an Länge zu und wirken spitzer, ähnlich der Linie TK188 und die kugelige Form des Zelleibs verändert sich zu einer eher länglichen Form. In der Zelllinie TK188 sind über den gesamten Versuchszeitraum kaum Veränderungen zu den TGF- β 1–inkubierten Zellen zu den Kontrollzellen sichtbar. Einzig an Tag 3 wirken die einzelnen Zellen unter TGF- β 1 schlechter differenzierbar als sie es unter der Kontrolle zu sein scheinen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die

morphologischen Veränderungen in beiden Zelllinien über den gesamten Versuchszeitraum hinweg eher marginal zu sein scheinen.

5.3.2 Einfluss von TGF- β 1 auf die SAT-1-mRNS-Expression

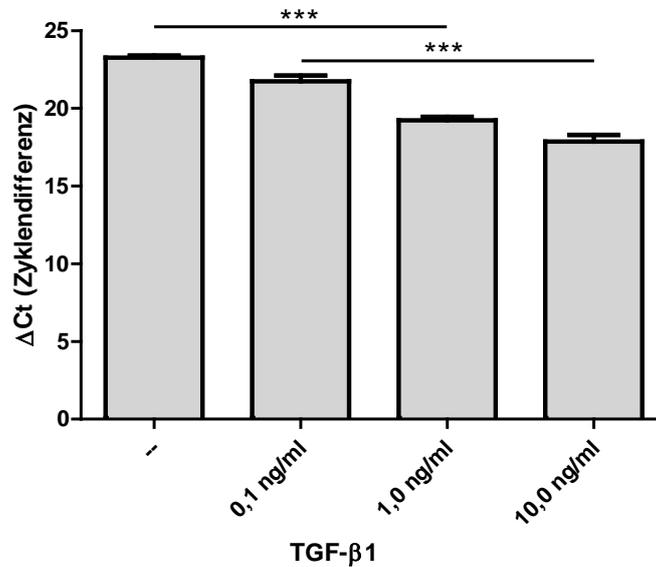


Abb. 5.6 Zelllinie TK173: Gehalt der SAT-1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1. mRNS-Menge von SAT-1 in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK173 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1, sowie die Kontrolle ohne TGF- β 1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: *** $p < 0,001$.

Die Menge an mRNS für SAT-1 nimmt in der Zelllinie TK173 im Vergleich zur Kontrolle (Δ Ct = 23,52 \pm 0,22) signifikant zu, wenn die Zellen für 3 Tage mit 1,0 ng/ml (Δ Ct = 19,22 \pm 0,39) und 10 ng/ml (Δ Ct = 17,87 \pm 0,74) TGF- β 1 inkubiert werden. Bereits bei 0,1 ng/ml (Δ Ct = 21,73 \pm 0,63) TGF- β 1 scheint sich eine Tendenz zu einer erhöhten Menge von mRNS des Transporters SAT-1 abzuzeichnen.

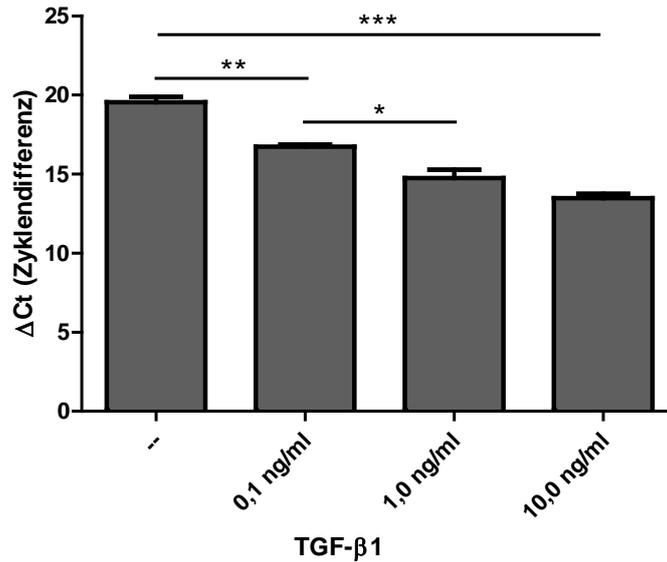


Abb. 5.7 Zelllinie TK188: Gehalt der SAT-1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1. mRNS-Menge von SAT-1 in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF-β1, sowie die Kontrolle ohne TGF-β1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

In der Zelllinie TK188 findet sich ebenfalls mit Steigerung der TGF-β1-Konzentration eine Erhöhung der mRNS-Menge für SAT-1. Signifikante Erhöhungen gegenüber der Kontrolle ($\Delta\text{Ct} = 19,54 \pm 0,58$) zeigen sich im Vergleich zur Zelllinie TK173 hier bereits bei einer Inkubation mit 0,1 ng/ml TGF-β1 ($\Delta\text{Ct} = 16,73 \pm 0,25$). Die mRNS-Menge steigt bei 1,0 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 14,74 \pm 0,91$) und 10,0 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 13,47 \pm 0,38$) TGF-β1 signifikant weiter an.

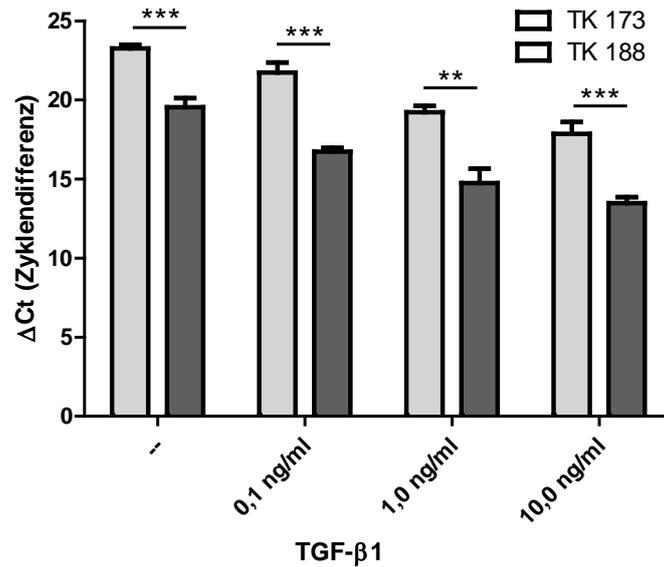


Abb. 5.8 Vergleich des SAT-1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. mRNS-Menge von SAT-1 in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK173 und TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF-β1, sowie der Kontrollen ohne TGF-β1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: ** p<0,01; *** p<0,001.

Es zeigt sich sehr deutlich, dass die Menge der mRNS von SAT-1 bereits in der Kontrolle ohne TGF-β1 in der Zelllinie TK188 ($\Delta\text{Ct} = 19,54 \pm 0,58$) signifikant höher ist als in der Zelllinie TK173 ($\Delta\text{Ct} = 23,25 \pm 0,22$). Dieser Unterschied bleibt in der Folge auch bei Zugabe von 0,1 ng/ml TGF-β1 (TK173: $\Delta\text{Ct} = 21,73 \pm 0,63$; TK188: $\Delta\text{Ct} = 16,73 \pm 0,25$), 1,0 ng (TK173: $\Delta\text{Ct} = 19,22 \pm 0,58$; TK188: $\Delta\text{Ct} = 14,74 \pm 0,91$) und 10 ng/ml (TK173: $\Delta\text{Ct} = 17,87 \pm 0,74$; TK188: $\Delta\text{Ct} = 13,47 \pm 0,38$) nahezu konstant, so dass abzuleiten wäre, dass der Einfluss des TGF-β1 auf beide Zelllinien die gleiche Tendenz zeigt, jedoch der Effekt leicht unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

5.3.3 Einfluss von TGF- β 1 auf die NaS_i-1-mRNS-Expression

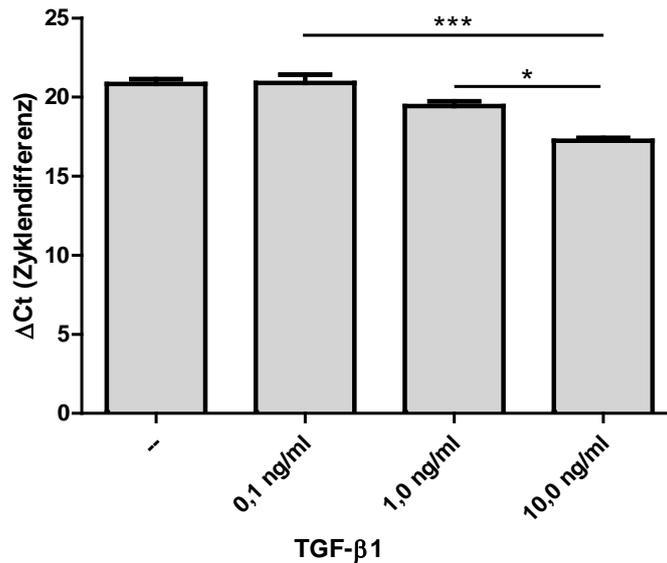


Abb. 5.9 Zelllinie TK173: Gehalt der NaS_i-1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1. mRNS-Menge von NaS_i-1 in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK173 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1, sowie der Kontrolle ohne TGF- β 1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * p<0,05; *** p<0,001.

Bezogen auf den Transporter NaS_i-1 scheint TGF- β 1 in der Zelllinie TK173 die mRNS-Menge erst ab einer Konzentration von 1,0 ng/ml (Δ Ct = 19,43 \pm 0,53) zu verändern. Unterschiede zwischen der Kontrolle ohne TGF- β 1 (Δ Ct = 20,83 \pm 0,52) und 0,1 ng/ml (Δ Ct = 20,89 \pm 0,91) sind dagegen nicht erkennbar. Signifikante Unterschiede ergeben sich im Vergleich der mRNS-Menge zwischen 0,1 ng/ml und 10 ng/ml (Δ Ct = 17,23 \pm 0,32) TGF- β 1, sowie zwischen 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1.

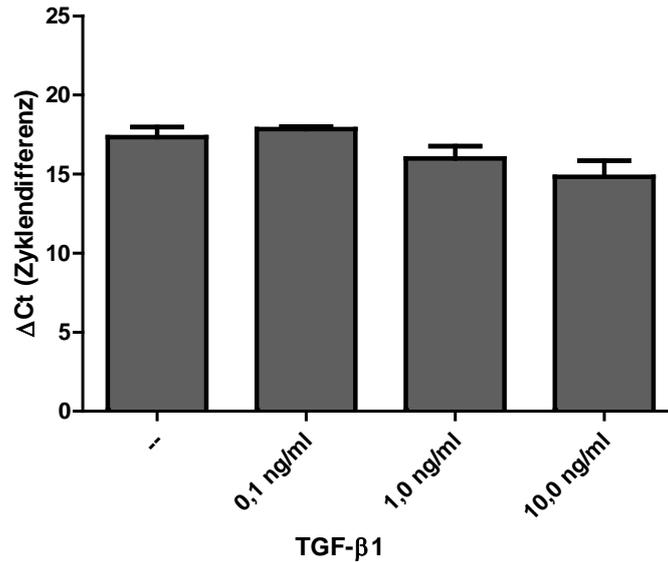


Abb. 5.10 Zelllinie TK188: Gehalt der NaSi-1-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1. mRNS-Menge von NaSi-1 in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF-β1, sowie der Kontrolle ohne TGF-β1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen.

In der Zelllinie TK188 zeigt sich zunächst kein Unterscheid zwischen der Kontrolle ohne TGF-β1 ($\Delta\text{Ct} = 17,33 \pm 1,13$) und der Inkubation mit 0,1 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 17,84 \pm 0,27$) TGF-β1. Leichte Unterschiede in der mRNS-Menge sind ab einer Inkubation von 1,0 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 15,99 \pm 1,33$) bzw. 10 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 14,83 \pm 1,34$) TGF-β1 zu erkennen. Die Steigerung der mRNS-Menge bleibt jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ und kann daher nur vermutet werden. Die Zelllinie TK188 scheint relativ insensitiv gegenüber TGF-β1 zu sein.

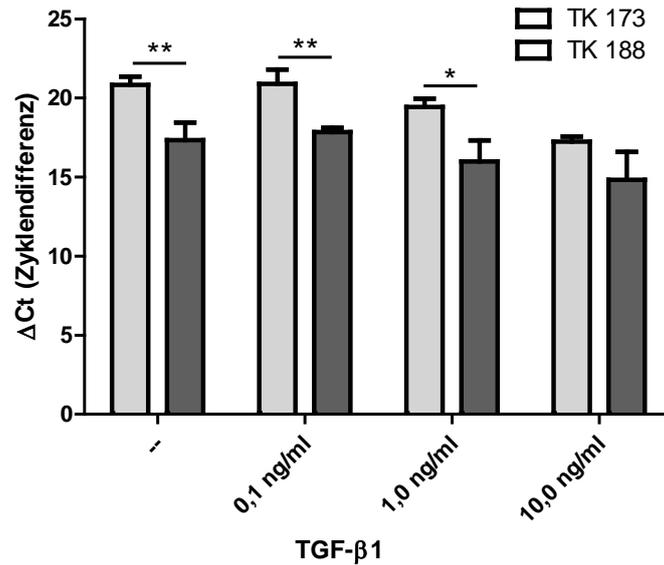


Abb. 5.11 Vergleich des NaS₁-1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. mRNS-Menge von NaS₁-1 in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK173 und TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF-β1, sowie der Kontrollen ohne TGF-β1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: * p<0,05; ** p<0,01.

Im Vergleich der beiden Zelllinien miteinander wird deutlich, dass auch hier – ähnlich wie bei SAT-1 – in der Zelllinie TK188 bereits in der unbehandelten Kontrolle signifikant mehr mRNS des Transporters NaS₁-1 vorliegt als in der Kontrolle der Zelllinie TK173 (TK173: ΔCt = 20,83 ± 0,52; TK188: ΔCt = 17,33 ± 1,13). Dieser Unterschied bleibt auch unter der Inkubation mit 1,0 ng/ml TGF-β1 zwischen beiden Zelllinien nahezu konstant (TK173: ΔCt = 20,89 ± 0,91; TK188: ΔCt = 17,84 ± 0,27). Diese Unterschiede lassen bei 1,0 ng/ml (TK173: ΔCt = 19,43 ± 0,53; TK188: ΔCt = 15,99 ± 1,33) und 10 ng/ml (TK173: ΔCt = 17,23 ± 0,32; TK188: ΔCt = 14,83 ± 1,34) leicht nach, so dass sich ableiten lässt, dass sich der Einfluss des TGF-β1 im Hinblick auf NaS₁-1 in höheren Konzentrationen auf TK173 stärker auswirkt als auf TK188.

5.3.4 Einfluss von TGF- β 1 auf den mRNA-Gehalt von α -glattes Gefäßmuskelaktin

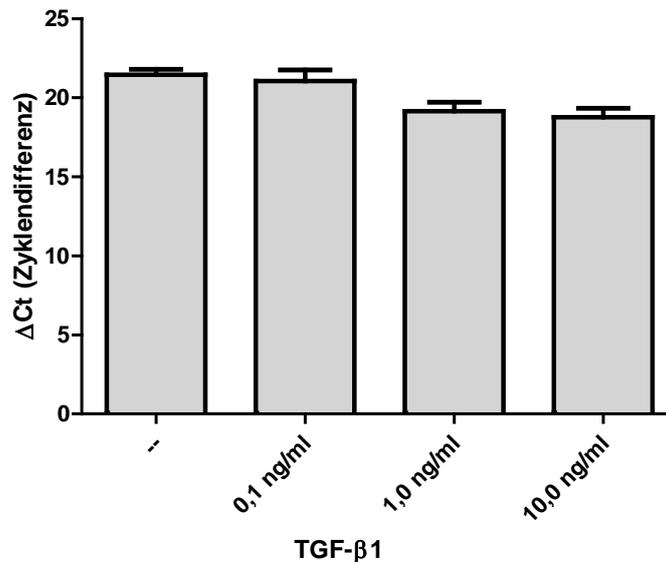


Abb. 5.12 Zelllinie TK173: Gehalt der α -sma-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1. mRNA-Menge von α -sma in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1, sowie der Kontrolle ohne TGF- β 1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen.

Der Einfluss des TGF- β 1 auf die mRNA-Menge des α -sma scheint bei niedriger Konzentration von 0,1 ng/ml (Δ Ct = 21,05 \pm 1,21) nicht vorhanden, da ein Unterschied zur Kontrolle ohne TGF- β 1 (Δ Ct = 21,45 \pm 0,61) nicht erkennbar ist. Bei einer Konzentration von 1,0 ng/ml (Δ Ct = 19,15 \pm 0,99) TGF- β 1 scheint ein leichter Anstieg der mRNA-Menge von α -sma stattzufinden, der jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ bleibt und sich von 1,0 ng/ml auf 10 ng/ml (Δ Ct = 18,77 \pm 0,98) nicht weiter steigert, d.h. TGF- β 1 induziert in den hier gewählten Konzentrationen keine signifikante Veränderung des mRNA-Gehalts von α -sma.

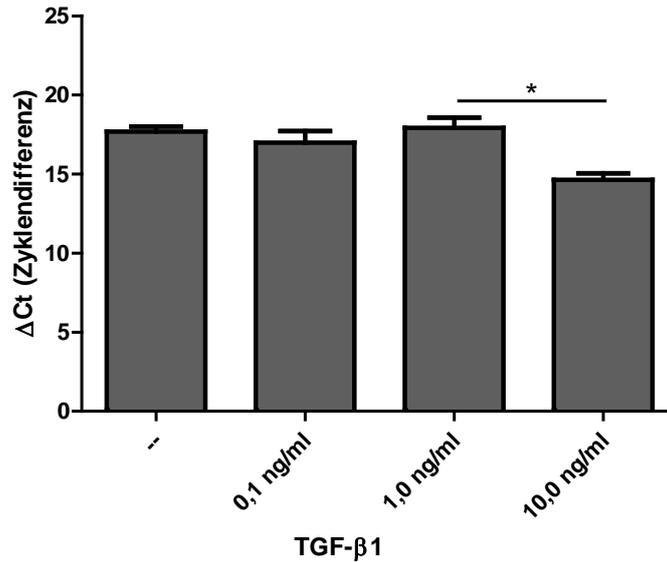


Abb. 5.13 Zelllinie TK188: Gehalt des α -sma-mRNS in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1. mRNS-Menge von α -sma in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1, sowie der Kontrolle ohne TGF- β 1. Die Werte fassen Mittelwerte 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$.

In der Zelllinie TK188 scheint TGF- β 1 in den Konzentrationen von 0,1 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 16,98 \pm 1,27$) und 1,0 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 17,92 \pm 1,13$) nach 3-tägiger Inkubation keinen Einfluss auf die mRNS-Menge von α -sma zu haben, da hier kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle ohne TGF- β 1 ($\Delta\text{Ct} = 17,69 \pm 0,56$) zu erkennen ist. Lediglich ab einer Konzentration von 10,0 ng/ml ($\Delta\text{Ct} = 14,64 \pm 0,56$) wird eine signifikante Steigerung der mRNS-Menge erreicht.

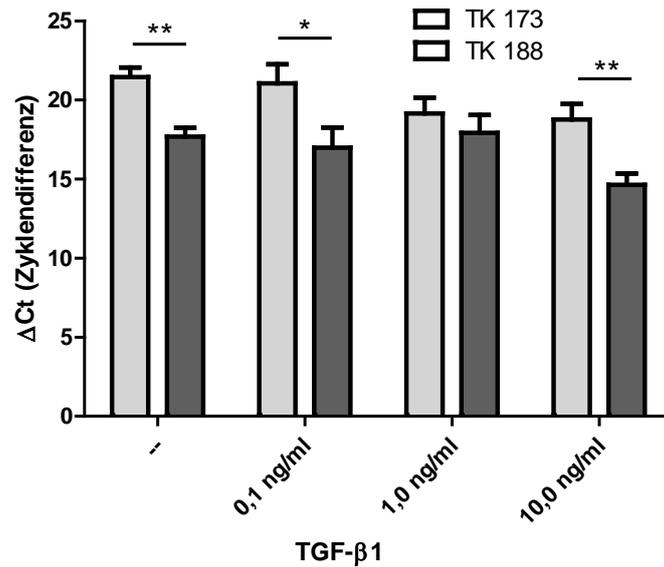


Abb. 5.14 Vergleich des α -sma-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. mRNS-Menge von α -sma in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK173 und TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1, sowie der Kontrollen ohne TGF- β 1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Wie auch schon bei den Transportern SAT-1 und NaS_i-1 zuvor gezeigt, hat die Zelllinie TK188 auch in diesem Fall bereits in der Kontrolle ohne TGF- β 1 (TK173: Δ Ct = 21,45 \pm 0,61; TK188: Δ Ct = 17,69 \pm 0,56) eine höhere Menge an mRNS für α -sma als die Zellen der Linie TK173. Dieser Unterschied bleibt auch zunächst bei der Inkubation mit 0,1 ng/ml (TK173: Δ Ct = 21,05 \pm 1,21; TK188: Δ Ct = 16,98 \pm 1,27) TGF- β 1 erhalten. Unter 1,0 ng/ml TGF- β 1 ist kein Unterschied im α -sma-mRNS-Gehalt zwischen den beiden Zelllinien zu detektieren (TK173: Δ Ct = 19,15 \pm 0,99; TK188: Δ Ct = 17,92 \pm 1,13). Erst unter Inkubation mit 10 ng/ml (TK173: Δ Ct = 18,77 \pm 0,98, TK188: Δ Ct = 14,64 \pm 0,56) ist dieser Unterschied dann wieder deutlich erkennbar.

5.3.5 Einfluss von TGF- β 1 auf den E-Cadherin-mRNS-Gehalt

Die folgenden Graphen unterscheiden sich von den vorangegangenen dadurch, dass hier nicht alle Messungen dreifach durchgeführt werden konnten. Die Ursache liegt darin, dass die qrtPCR für E-CDH mit 45 Zyklen programmiert wurde, welches bereits eine sehr hohe Zyklenzahl am Rande der biologischen Nachweisgrenze darstellt. In den Resultaten zeigte sich dann, dass bereits nach Zugabe geringster Mengen von TGF- β 1 der Schwellenwert (Ct, *Threshold*) der mRNS für E-CDH knapp unter 45 Zyklen lag. Es ist also davon auszugehen, dass die nicht durch die qrtPCR detektierbaren Werte jenseits von 45 Zyklen lagen.

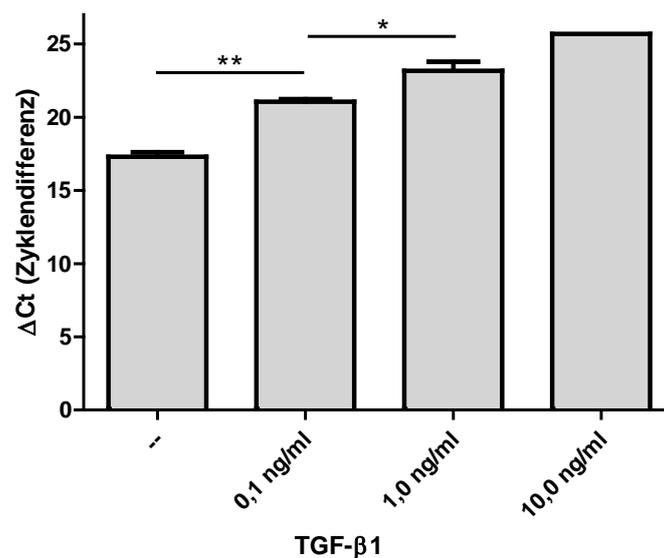


Abb. 5.15 Zelllinie TK173: mRNS-Gehalt des epithelialen Markers E-CDH in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF- β 1. mRNS-Menge von E-CDH in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1, sowie der Kontrolle ohne TGF- β 1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Eine Ausnahme hiervon bilden der Wert für 10 ng/ml: Hier konnte jeweils nur einmal in der qrtPCR ein Nachweis geführt werden: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Der epitheliale Marker E-CDH verhält sich in der Zelllinie TK173 im Vergleich zu den bisher betrachteten Proteinen entgegengesetzt. Bei zunehmender Konzentration von TGF- β 1 nimmt die Menge an mRNS für das Bindeprotein ab. Bereits die Zugabe von 0,1 ng/ml TGF- β 1 (Δ Ct = $21,05 \pm 0,30$) zeigt eine signifikante Abnahme der mRNS-Menge im Vergleich zur Kontrolle (Δ Ct = $17,30 \pm 0,52$). Diese Abnahme schreitet bei 1,0 ng/ml (Δ Ct = $23,17 \pm 1,05$) weiter fort und scheint bei 10 ng/ml (Δ Ct = $25,68$) kaum noch nachweisbar zu sein. Denn es konnte für 10 ng/ml in drei Versuchen lediglich ein Wert knapp unterhalb der maximalen Zyklenzahl detektiert werden.

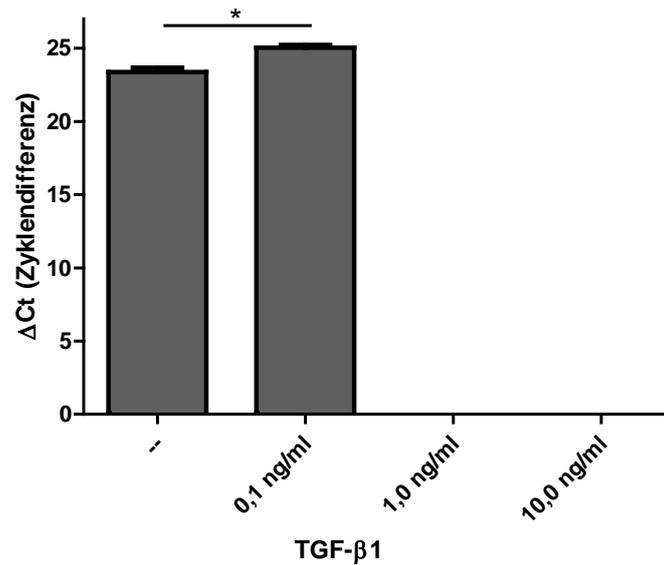


Abb. 5.16 Zelllinie TK188: Gehalt des epithelialen Markers E-CDH in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen an TGF-β1. mRNA-Menge von E-CDH in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10/ml ng TGF-β1, sowie die Kontrolle ohne TGF-β1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Eine Ausnahme hiervon bilden die Werte für 1,0 ng/ml und 10 ng/ml: Hier wurde in der qrtPCR keine mRNA mehr nachgewiesen, * p<0,05.

In der Zelllinie TK188 lag die mRNA-Menge für E-CDH bereits bei der Inkubation mit 0,1 ng/ml TGF-β1 schon am Rande der Nachweisgrenze und war bei 1,0 ng/ml und 10,0 ng/ml in der qrtPCR nicht mehr detektierbar. Also auch hier ist eine starke Abnahme der mRNA-Menge für E-CDH durch den Einfluss des TGF-β1 anzunehmen. Eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge ist hier bereits zwischen der Kontrolle ($\Delta\text{Ct} = 23,37 \pm 0,52$) und der Inkubation mit 0,1 ng/ml TGF-β1 ($\Delta\text{Ct} = 25,03 \pm 0,24$) erkennbar.

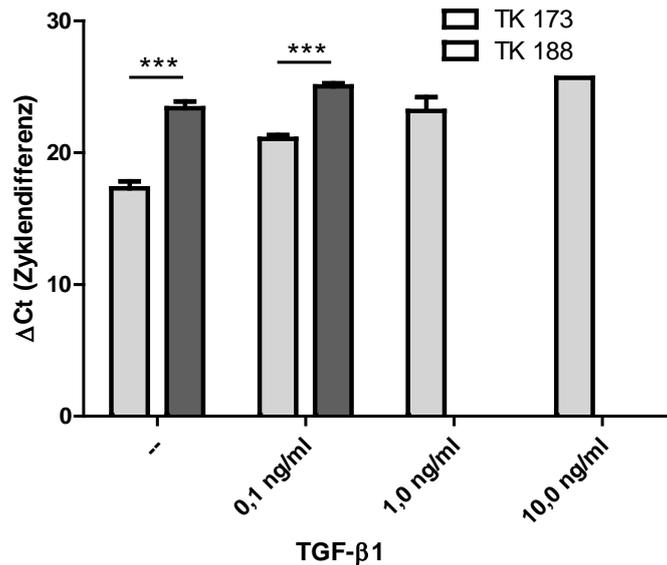


Abb. 5.17 Vergleich des E-CDH-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188. mRNS-Menge von E-CDH in Zyklendifferenzen nach 3-tägiger Inkubation der Zelllinie TK173 und TK188 mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF-β1, sowie der Kontrollen ohne TGF-β1. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Eine Ausnahme bilden die Werte der Zelllinie TK188 für 1,0 ng/ml und 10 ng/ml, da hier in der qrtPCR keine mRNS mehr nachgewiesen werden konnte. Für den Wert bei 10 ng/ml in der Zelllinie TK173 konnte lediglich ein Wert gemessen werden. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: *** $p < 0,001$.

In den Zellen der Linie TK173 liegt bereits in der Kontrolle ohne TGF-β1 eine deutlich höhere mRNS-Menge für E-CDH vor als in der Zelllinie TK188. Die mRNS-Menge nimmt jedoch in beiden Zelllinien bereits nach Zugabe von 0,1 ng/ml TGF-β1 ab, in der Zelllinie TK173 allerdings wesentlich stärker als in der Linie TK188. Nach der Zugabe von 1,0 ng/ml setzt sich dieser Trend in der Zelllinie TK173 deutlich fort und die mRNS-Menge nimmt bei 10 ng/ml weiterhin deutlich ab, was jedoch aufgrund fehlender Werte bei Messungen am Rande der biologischen Nachweisbarkeitsgrenze nur vermutet werden kann.

5.4 Einfluss von Hypoxie auf die Zelllinien TK173 und TK188

Um den Einfluss von Hypoxie auf die beiden Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen nach Zelllinien getrennt in zwei Ansätzen der gleichen Passage zunächst in Petrischalen gemeinsam unter normoxischen Bedingungen (21% Luftsauerstoff, 37°C) subkonfluent angezchtet und im Anschluss eine Petrischale jeder Zelllinie weiter unter normoxischen Bedingungen inkubiert, während je eine andere Schale in

ein hypoxisches Milieu (1% Luftsauerstoff, 37°C) gegeben wurde. Die Inkubationsdauern in Hypoxie bzw. in Normoxie betragen jeweils 2, 4, 6, 9, 12 sowie 24 Stunden.

5.4.1 Einfluss von Hypoxie auf den SAT-1-mRNS-Gehalt

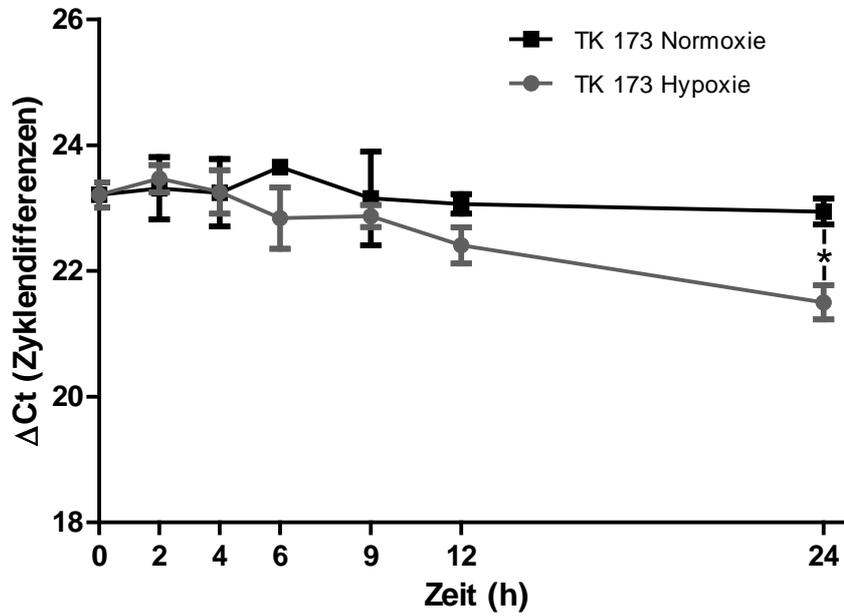


Abb. 5.18 Zelllinie TK173: Gehalt von SAT-1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von SAT-1 in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK173 unter Hypoxiebedingungen, sowie die Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$.

Ein erkennbarer Einfluss der Hypoxie auf die mRNS-Menge von SAT-1 in der Zelllinie TK173 wird in dieser Versuchsanordnung ab etwa 12 Stunden Inkubationsdauer erreicht. Während die Kontrolle unter Normoxie nahezu konstante Mengen an mRNS für SAT-1 über alle Messzeitpunkte erkennen lässt, scheint die Hypoxie ab 12 Stunden Inkubationsdauer eine Erhöhung der mRNS-Menge zu induzieren, die bei 24 Stunden Inkubationsdauer bereits einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufweist (Normoxie 24h: $\Delta Ct = 22,94 \pm 0,29$; Hypoxie 24h: $\Delta Ct = 21,50 \pm 0,47$).

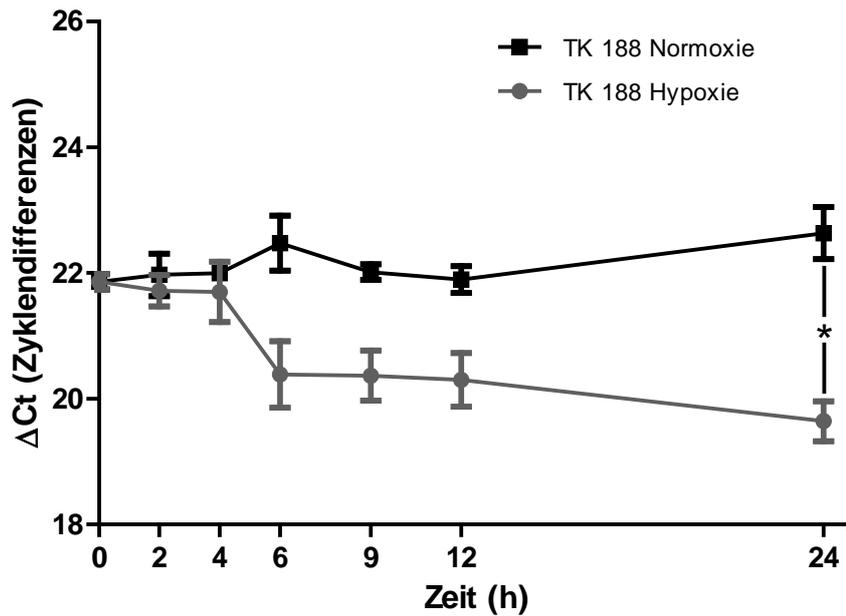


Abb. 5.19 Zelllinie TK188: Gehalt von SAT-1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von SAT-1 in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK188 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$.

Die Zelllinie TK188 zeigt im Vergleich zu TK173 bereits ab 6 Stunden (Normoxie 6h: $\Delta Ct = 22,47 \pm 0,61$; Hypoxie 6h: $\Delta Ct = 20,39 \pm 0,99$) eine deutliche Erhöhung der mRNS-Menge für SAT-1, die jedoch das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht und erst bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden (Normoxie 24h: $\Delta Ct = 22,63 \pm 0,59$; Hypoxie 24h: $\Delta Ct = 19,64 \pm 0,55$) deutlich signifikant wird. Die Kontrolle unter normoxischen Bedingungen weist nur geringe Schwankungen der mRNS-Menge über einen Zeitraum von 24 Stunden auf.

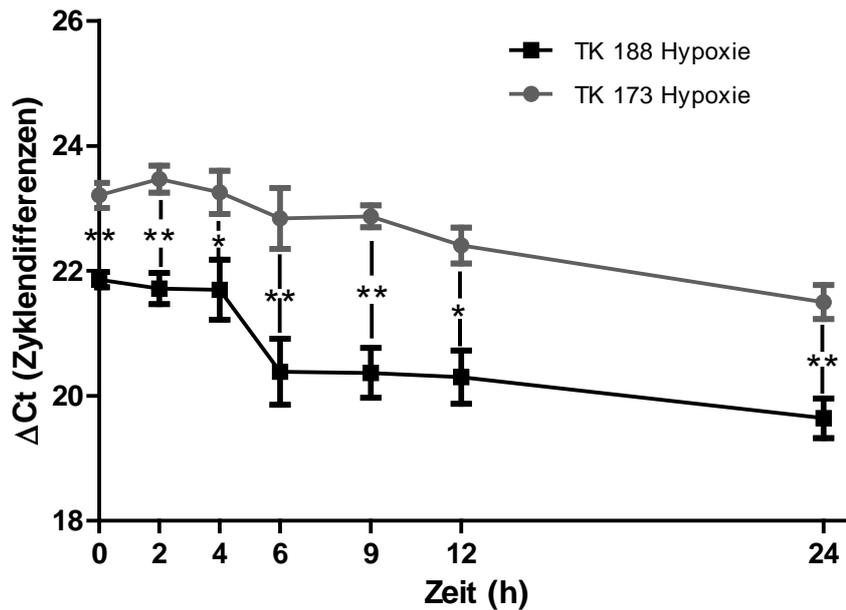


Abb. 5.20 Vergleich des SAT-1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von SAT-1 in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinien TK173 und TK188 unter Hypoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Wie bereits in den Versuchen mit TGF- β 1 erkennbar, unterscheiden sich die beiden Zelllinien bereits a priori in der Menge der SAT-1-mRNS voneinander: Die mRNS-Menge in der Zelllinie TK188 ist höher als in der Linie TK173 (TK173 0h: $\Delta\text{Ct} = 23,24 \pm 0,21$; TK188 0h: $\Delta\text{Ct} = 21,67 \pm 0,35$). Im Verlauf der Inkubation unter hypoxischen Bedingungen bleibt dieser Unterschied nahezu unverändert, zeigt jedoch nach 6 Stunden Hypoxie kurzfristige Schwankungen (TK173 6h: $\Delta\text{Ct} = 22,84 \pm 0,84$; TK188 6h: $\Delta\text{Ct} = 20,39 \pm 0,99$), die jedoch nach 24 Stunden wieder einen Unterschied auf dem Ausgangsniveau erreichen (TK173 24h: $\Delta\text{Ct} = 21,50 \pm 0,47$; TK188 24h: $\Delta\text{Ct} = 19,64 \pm 0,55$), so dass insgesamt davon ausgegangen werden kann, dass beide Zelllinien im Hinblick auf die mRNS-Menge von SAT-1 ähnlich auf den Einfluss von Hypoxie reagieren.

5.4.2 Einfluss von Hypoxie auf den NaS_i-1-mRNS-Gehalt

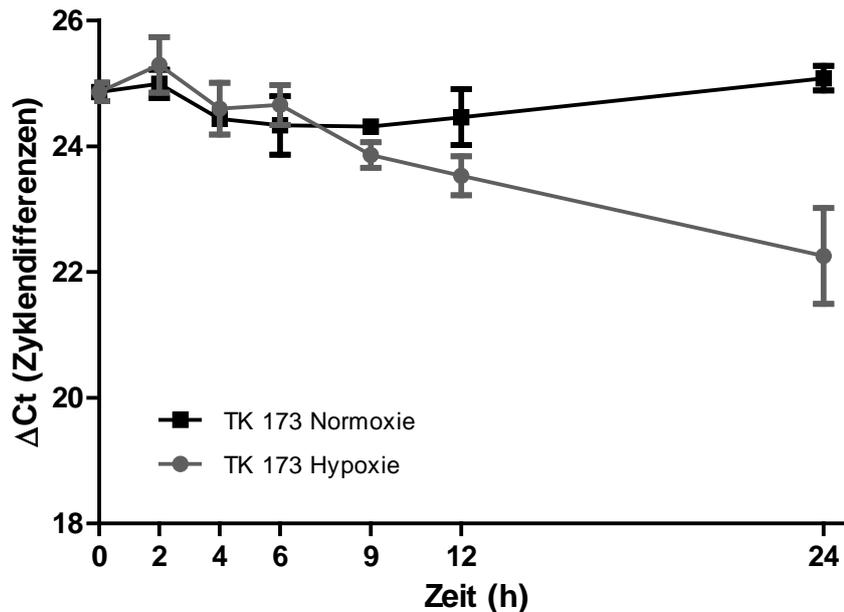


Abb. 5.21 Zelllinie TK173: Gehalt von NaS_i-1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von NaS_i-1 in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK173 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationszeiten betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen.

In den ersten 6 Stunden der Inkubation unter Hypoxie veränderte sich die mRNS-Menge des NaS_i-1 in der Zelllinie TK173 nicht. Während sich die Kontrolle zu allen Zeitpunkten der Inkubation nahezu konstant in Bezug auf die mRNS-Expression verhält, kann bei 12-stündiger Inkubationsdauer unter Hypoxie ein leichter Anstieg der mRNS-Menge für NaS_i-1 vermutet werden (Normoxie 12h: $\Delta\text{Ct} = 24,47 \pm 0,63$; Hypoxie 12h: $\Delta\text{Ct} = 23,53 \pm 0,54$), der sich nach 24 Stunden noch deutlicher darstellt (Normoxie 24h: $\Delta\text{Ct} = 25,08 \pm 0,28$; Hypoxie 24h: $\Delta\text{Ct} = 22,25 \pm 1,32$), jedoch die Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ nicht erreicht ($p = 0,06$).

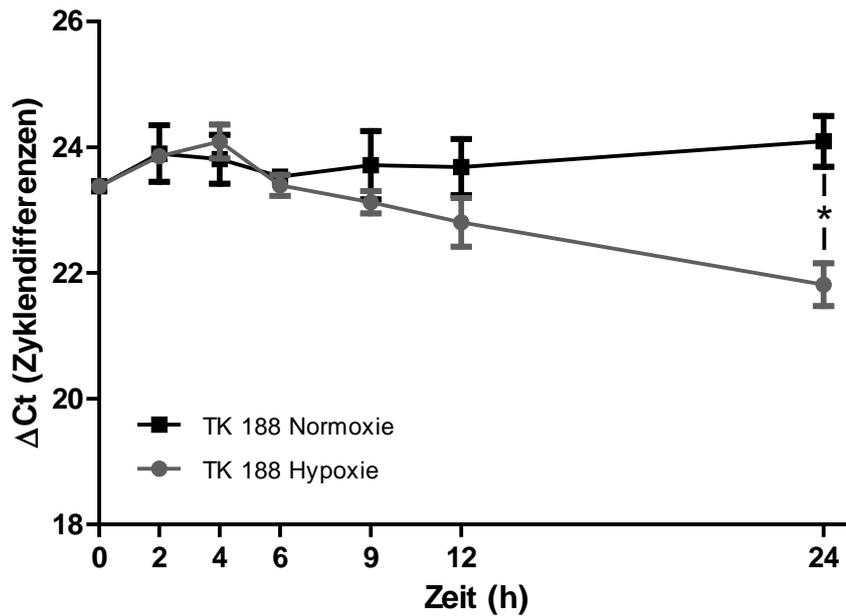


Abb. 5.22 Zelllinie TK188: Gehalt von NaSi-1-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von NaSi-1 in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK188 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * p<0,05.

Die Zelllinie TK188 verhält sich in Bezug auf die NaSi-1-mRNS-Expression nahezu analog zur Linie TK173. Ein erster leichter Unterschied der mRNS-Menge zwischen Kontrolle und Hypoxie scheint ab einer 12-stündigen Inkubation zu existieren (Normoxie 12h: $\Delta\text{Ct} = 23,68 \pm 0,63$; Hypoxie 12h: $\Delta\text{Ct} = 22,80 \pm 0,67$). Dieser ist jedoch zunächst noch sehr gering, erreicht jedoch nach 24-stündiger Inkubation ein signifikantes Niveau (Normoxie 24h: $\Delta\text{Ct} = 24,09 \pm 0,57$; Hypoxie 24h: $\Delta\text{Ct} = 21,81 \pm 0,59$).

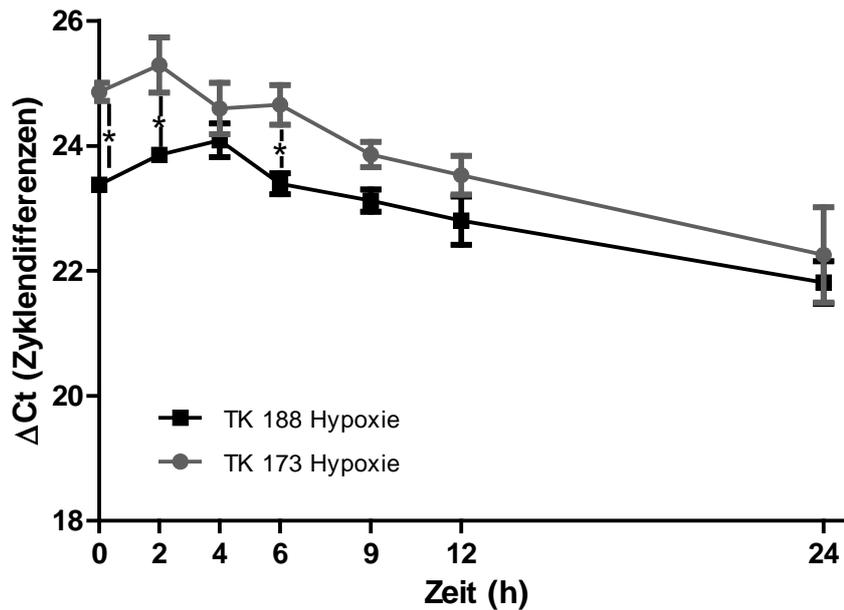


Abb. 5.23 Vergleich des NaS₁-1-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von NaS₁-1 in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinien TK173 und TK188 unter Hypoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: * p<0,05.

Bei einem Vergleich der mRNS-Menge für NaS₁-1 werden bereits vor Beginn der hypoxischen Inkubation in der Zelllinie TK188 höhere Werte als in der Linie TK173 beobachtet (TK173 0h: $\Delta\text{Ct} = 24,78 \pm 0,21$; TK188 0h: $\Delta\text{Ct} = 23,49 \pm 0,20$). Diese nehmen in beiden Zelllinien im Verlauf der Inkubation zu und erreichen nach 24 Stunden etwa die gleiche mRNS-Menge für NaS₁-1 (TK173 24h: $\Delta\text{Ct} = 22,25 \pm 1,32$; TK188 24h: $\Delta\text{Ct} = 21,81 \pm 0,59$).

5.4.3 Einfluss von Hypoxie auf den alpha-glattes-Gefäßmuskelaktin-mRNS-Gehalt

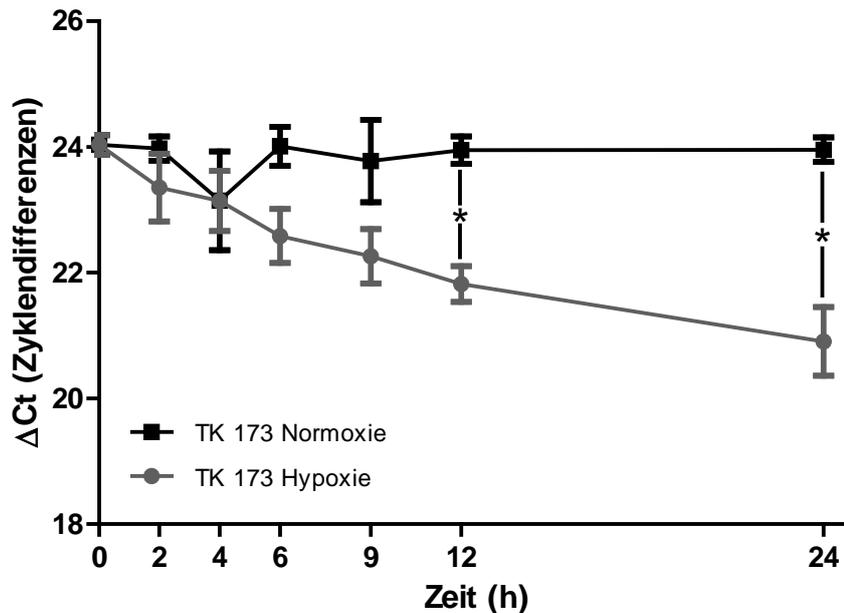


Abb. 5.24 Zelllinie TK173: Gehalt von α -sma in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNA-Menge von α -sma in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK173 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$.

Bei der Betrachtung der mRNA-Menge für α -sma wird in der Zelllinie TK173 bereits nach 6-stündiger Inkubation eine deutlich höhere mRNA-Menge unter Hypoxie im Gegensatz zur Kontrolle detektiert (Normoxie 6h: $\Delta Ct = 24,01 \pm 0,44$; Hypoxie 6h: $\Delta Ct = 22,58 \pm 0,74$). Die α -sma-mRNA-Menge nimmt im Verlauf weiter zu, so dass der Unterschied zwischen Hypoxie und Kontrolle bereits nach 12-stündiger Inkubation signifikant ist (Normoxie 12h: $\Delta Ct = 23,95 \pm 0,31$; Hypoxie 12h: $\Delta Ct = 21,82 \pm 0,49$). Dieser Unterschied nimmt durch steigende mRNA-Mengen von α -sma bis hin zu 24 Stunden noch weiter zu (Normoxie 24h: $\Delta Ct = 23,95 \pm 0,28$; Hypoxie 24h: $\Delta Ct = 20,90 \pm 0,95$). Die mRNA-Menge der Kontrolle bleibt über den untersuchten Zeitraum mit Ausnahme des 4-Stunden-Wertes (Normoxie 4h: $\Delta Ct = 23,14 \pm 1,11$), der eine hohe Standardabweichung aufweist, nahezu konstant.

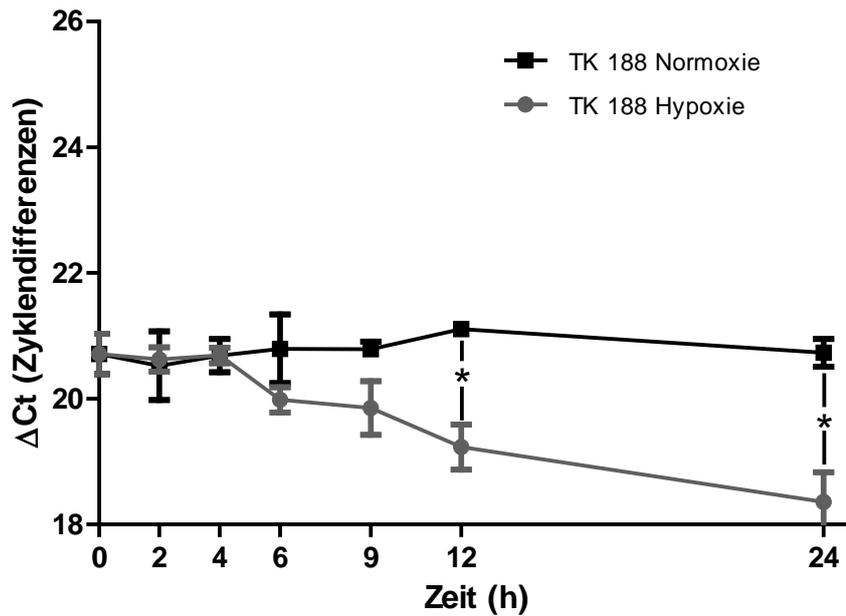


Abb. 5.25 Zelllinie TK188: Gehalt von α -sma-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von α -sma in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK188 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$.

In der Zelllinie TK188 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Hypoxie und Kontrolle erst nach 9-stündiger Inkubation der Zellen. Während die Kontrolle über die gesamte Inkubationsdauer nahezu konstante mRNS-Mengen anzeigt, nimmt die mRNS-Menge für α -sma und Hypoxie zu (Normoxie 9h: $\Delta Ct = 20,79 \pm 0,17$; Hypoxie 9h: $\Delta Ct = 19,85 \pm 0,74$). Dieser Unterschied hat bereits nach 12 Stunden die Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ erreicht (Normoxie 12h: $\Delta Ct = 21,11 \pm 0,10$; Hypoxie 12h: $\Delta Ct = 19,23 \pm 0,62$) und steigt bis hin zu 24 Stunden noch weiter an (Normoxie 24h: $\Delta Ct = 20,73 \pm 0,31$; Hypoxie 24h: $\Delta Ct = 18,36 \pm 0,82$). Die mRNS-Menge der Kontrolle bleibt über die gesamte Zeitdauer der Inkubation nahezu konstant.

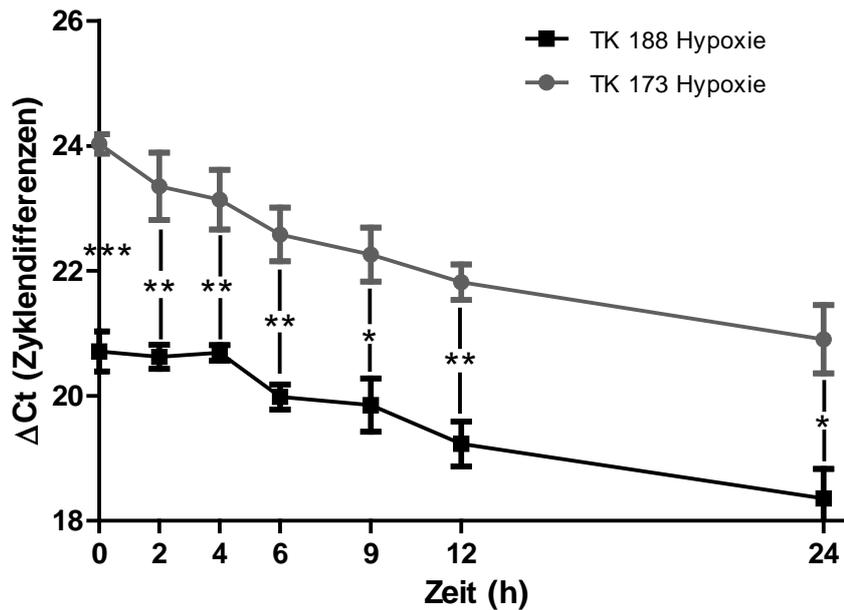


Abb. 5.26 Vergleich des α -sma-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von α -sma in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinien TK173 und TK188 unter Hypoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Im Vergleich der beiden Zelllinien wird bereits zu Beginn des Versuchs ohne Hypoxie ein deutlicher Unterschied in der Menge der vorhandenen mRNS für α -sma deutlich. Die Zelllinie TK188 weist eine wesentlich höhere Menge auf als die Linie TK173 (TK173 0h: $\Delta\text{Ct} = 24,03 \pm 0,22$; TK188 0h: $\Delta\text{Ct} = 20,71 \pm 0,45$). Dieser Unterschied verringert sich nach 2-stündiger Inkubation unter Hypoxie leicht, indem die mRNS-Menge für α -sma in der Zelllinie TK173 steigt (TK173 2h: $\Delta\text{Ct} = 23,35 \pm 0,93$; TK188 2h: $\Delta\text{Ct} = 20,62 \pm 0,33$). Dieser Unterschied bleibt dann bis hin zu 24 Stunden nahezu konstant (TK173 24h: $\Delta\text{Ct} = 22,47 \pm 0,61$; TK188 24h: $\Delta\text{Ct} = 20,45 \pm 0,99$).

5.4.4 Einfluss von Hypoxie auf den E-Cadherin-mRNS-Gehalt

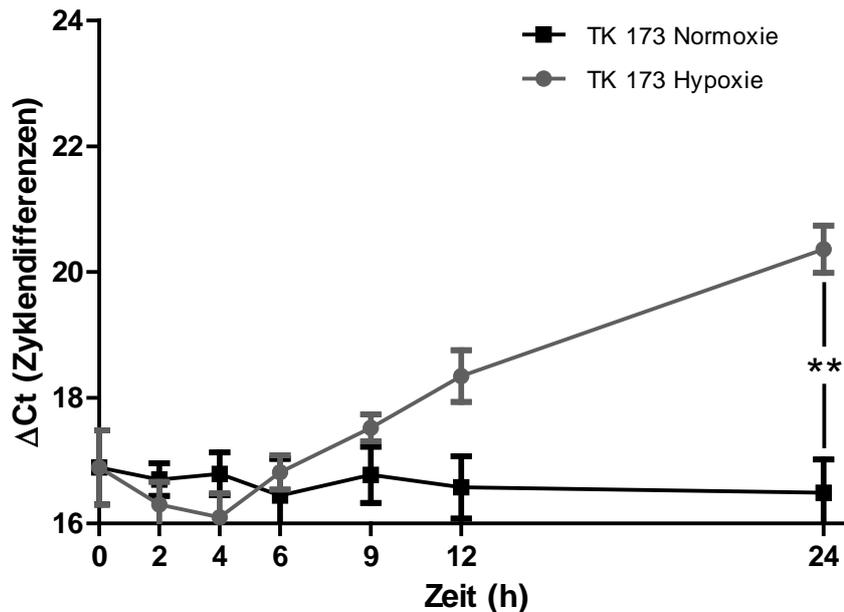


Abb. 5.27 Zelllinie TK173: Gehalt von E-Cadherin-mRNS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von E-Cadherin in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK173 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: ** p<0,01.

Die Zelllinie TK173 zeigt bei der Inkubation zunächst die Tendenz unter Hypoxie die mRNS-Menge des epithelialen Markers E-CDH zu steigern (Hypoxie 0h: $\Delta\text{Ct} = 16,64 \pm 0,73$; Hypoxie 2h: $\Delta\text{Ct} = 16,30 \pm 0,62$; Hypoxie 4h: $\Delta\text{Ct} = 16,10 \pm 0,47$). Jedoch fällt nach 12-stündiger Inkubation unter Hypoxie die mRNS-Menge von E-CDH im Vergleich zur Kontrolle sichtbar ab (Normoxie 12h: $\Delta\text{Ct} = 16,57 \pm 0,70$; Hypoxie 12h: $\Delta\text{Ct} = 18,34 \pm 0,71$). Nach 24-stündiger Inkubation wird dann eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedrigere mRNS-Menge für E-Cadherin erreicht (Normoxie 24h: $\Delta\text{Ct} = 16,49 \pm 0,75$; Hypoxie 24h: $\Delta\text{Ct} = 20,36 \pm 0,65$). Die Kontrolle bleibt über die gesamte Zeitdauer der Inkubation nahezu konstant.

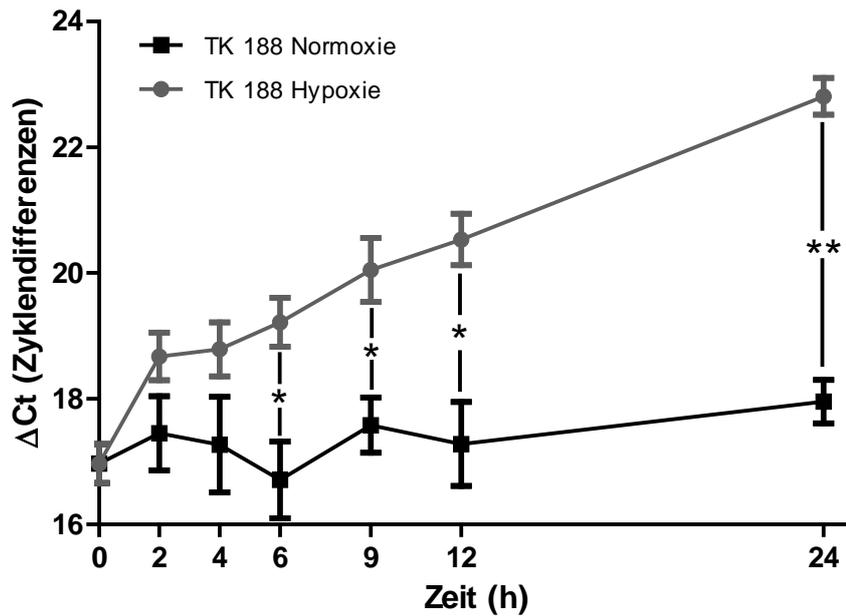


Abb. 5.28 Zelllinie TK188: Gehalt von E-Cadherin in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNA-Menge von E-Cadherin in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinie TK188 unter Hypoxiebedingungen, sowie der Kontrolle unter Normoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

In der Zelllinie TK188 zeigt sich bereits nach 2 Stunden ein deutlicher Abfall der mRNA-Menge für E-Cadherin unter Hypoxie (Normoxie 2h: $\Delta Ct = 17,45 \pm 0,83$; Hypoxie 2h: $\Delta Ct = 18,67 \pm 0,65$). Der Unterschied zur Kontrolle ist bereits nach 6 Stunden signifikant (Normoxie 6h: $\Delta Ct = 16,71 \pm 0,87$; Hypoxie 6h: $\Delta Ct = 19,21 \pm 0,67$) und die mRNA-Menge von E-Cadherin fällt dann kontinuierlich weiter. Nach 24 Stunden ist der Unterschied zwischen Kontrolle und Hypoxie dann maximal groß (Normoxie 24h: $\Delta Ct = 17,95 \pm 0,49$; Hypoxie 24h: $\Delta Ct = 22,81 \pm 0,50$).

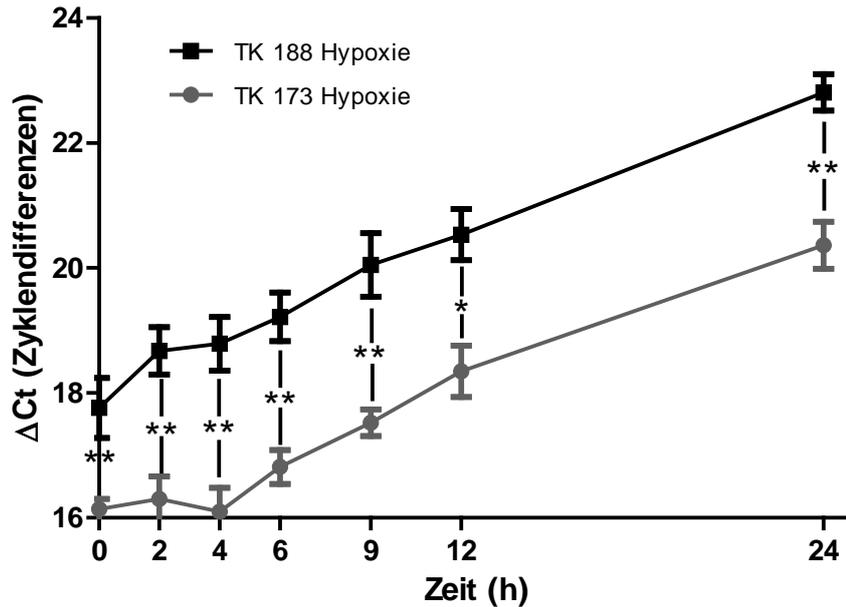


Abb. 5.29 Vergleich des E-Cadherin-mRNS-Gehalts in den Zelllinien TK173 und TK188 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer unter Hypoxie. mRNS-Menge von E-Cadherin in Zyklendifferenzen nach Inkubation der Zelllinien TK173 und TK188 unter Hypoxiebedingungen. Die Inkubationsdauern betragen dabei jeweils 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden. Die Werte fassen Mittelwerte aus 3 Messungen unterschiedlicher Zellpassagen zusammen. Signifikanzen jeweils im t-Test der beiden Zelllinien gegeneinander: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Bei der Betrachtung des Bindeproteins E-Cadherin wird im Vergleich der beiden Zelllinien bereits zu Beginn deutlich, dass die Zelllinie TK188 wesentlich weniger mRNS des Bindeproteins besitzt als die Linie TK173 (TK173 0h: $\Delta\text{Ct} = 16,64 \pm 0,73$; TK188 0h: $\Delta\text{Ct} = 17,39 \pm 0,80$). Dieser Unterschied wird unter Hypoxie zunächst bis zur Stunde 4 größer (TK173 4h: $\Delta\text{Ct} = 16,10 \pm 0,66$; TK188 4h: $\Delta\text{Ct} = 18,79 \pm 0,74$), verringert sich dann ab 6-stündiger Hypoxiedauer jedoch wieder (TK173 6h: $\Delta\text{Ct} = 16,81 \pm 0,47$; TK188 6h: $\Delta\text{Ct} = 19,21 \pm 0,67$) und bleibt dann bis einschließlich Stunde 24 nahezu konstant (TK173 24h: $\Delta\text{Ct} = 20,36 \pm 0,65$; TK188 24h: $\Delta\text{Ct} = 22,81 \pm 0,50$).

5.5 Einfluss von Hypoxie auf die SAT-1 - Protein - Expression

Da zum Versuchszeitpunkt für NaS_i-1 kein Antikörper kommerziell zu erwerben war, wurde der Proteinnachweis im Western Blot auf den Transporter SAT-1 beschränkt.

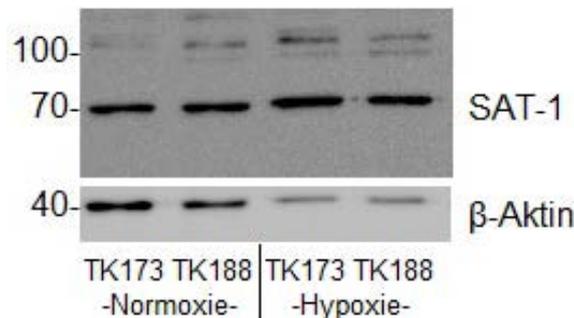


Abb. 5.30 Nachweis von SAT-1-Protein nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie. Western Blot der Proteine aus den Zelllinien TK173 und TK188 nach Inkubation in Hypoxie (1% O₂) bzw. Normoxie (21% O₂) für 24 Stunden. Es wurden anti-β-Aktin- und anti-SAT-1-Antikörper verwendet. Dargestellt ist ein Beispielergebnis einer Serie von Experimenten, die mit 7 unterschiedlichen Passagen durchgeführt wurden.

Im Western Blot konnte für beide Zelllinien unter Hypoxie und Normoxie jeweils eine deutliche Bande bei etwa 70 kDa detektiert werden. Neben dieser konnten weitere Banden knapp über und unter 100 kDa detektiert werden. β-Aktin stellte das *housekeeping*-Protein dar. In sieben durchgeführten Versuchen konnte mithilfe der densitometrischen Auswertung kein konsistentes Ergebnis hinsichtlich der Proteinmengen erzielt werden. Interessant hierbei war, dass hypoxische Inkubationsbedingungen das *housekeeping*-Protein β-Aktin stärker zu beeinflussen scheinen als SAT-1. Diesem sollte in weiterführenden Versuchen, die den Umfang dieser Arbeit sprengen würden, nachgegangen werden.

5.6 Einfluss von Hypoxie auf die [³⁵S]Sulfataufnahme

Der Sulfataufnahme-Versuch wurde mit beiden Zelllinien durchgeführt, die jeweils entweder unter Normoxie oder Hypoxie für 24 Stunden inkubiert wurden. Um die an der Sulfataufnahme beteiligten Transporter einzeln bestimmen zu können, wurden verschiedene Aufnahmemedien eingesetzt. In einem Natrium-freien Medium sollte die Aufnahme von Sulfat über NaS_i-1 gehemmt sein, da dieser Natrium als Co-Substrat obligat benötigt. DIDS fungiert als Hemmstoff der Aufnahme von Sulfat über SAT-1.

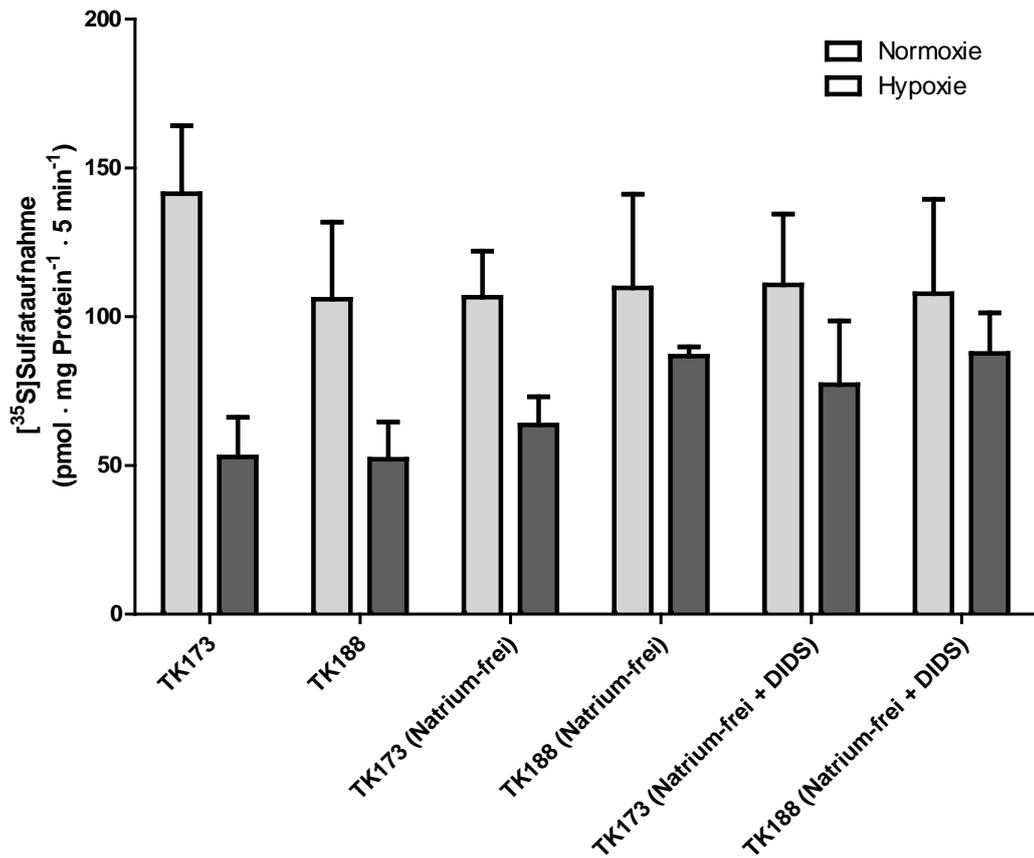


Abb. 5.31 Darstellung der [³⁵S]Sulfataufnahme in die Zelllinien TK173 und TK188 nach 24-stündiger Inkubation unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (1% O₂). Aufgetragen sind jeweils die aufgenommenen [³⁵S]Sulfatmengen in pmol / mg Protein gegen die jeweilige Zelllinie in Hypoxie und Normoxie bzw. unter Zugabe des jeweiligen Co-Substrats bzw. Hemmstoffs. Die Inkubationszeit in dem [³⁵S]Sulfat-haltigen Aufnahme-medium betrug 5 min. Die Werte fassen 4 Messwerte verschiedener Zellpassagen zusammen.

Unabhängig von den gewählten Versuchsbedingungen war die Aufnahme von Sulfat in Zellen, die unter Normoxie für 24 Stunden inkubiert wurden höher als in Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen für 24 Stunden inkubiert wurden. Ein Unterschied zwischen beiden Zelllinien ist hingegen kaum erkennbar. Ebenso hat – bei hoher Standardabweichung – das gewählte Aufnahme-medium unter normoxischer Inkubation keinen Einfluss auf die Aufnahme von Sulfat in die Zellen. Unter hypoxischen Bedingungen scheint die Aufnahme in Natrium-freiem Medium in der Zelllinie TK188 gegenüber der Linie TK173 leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht.

| Zelllinie | Bedingung | Aufnahmemedium | Mittelwert ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein) | Standard- abweichung |
|-----------|-----------|---------------------|--|-------------------------|
| TK173 | Normoxie | | 141,3 | 22,9 |
| | Hypoxie | | 52,9 | 13,3 |
| TK188 | Normoxie | | 105,9 | 25,8 |
| | Hypoxie | | 52,1 | 12,5 |
| TK173 | Normoxie | Natrium-frei | 106,6 | 15,5 |
| | Hypoxie | Natrium-frei | 63,6 | 9,6 |
| TK188 | Normoxie | Natrium-frei | 109,7 | 31,5 |
| | Hypoxie | Natrium-frei | 86,8 | 3,1 |
| TK173 | Normoxie | Natrium-frei + DIDS | 110,7 | 23,8 |
| | Hypoxie | Natrium-frei + DIDS | 77,1 | 21,5 |
| TK188 | Normoxie | Natrium-frei + DIDS | 107,8 | 31,7 |
| | Hypoxie | Natrium-frei + DIDS | 87,7 | 13,6 |

Tab. 5.1 Aufnahme von [^{35}S]Sulfat in die Zelllinien TK173 und TK188 unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sowie in Abhängigkeit vom Aufnahmemedium.

6 Diskussion

Diabetes mellitus und chronischer Hypertonus zählen in den Industrieländern der Welt zu den großen Volkskrankheiten mit steigender Inzidenz. In der Folge dieser Erkrankungen kommt es häufig zu einer Mitbeteiligung der Nieren in Form von vaskulären Nephropathien, Glomerulosklerose und anderen chronischen Nierenerkrankungen. Dabei spielt die Fibrosierung der Niere als Pathomechanismus eine entscheidende Rolle bei der Einschränkung der Nierenfunktion. Die Fibrose wird mithilfe vieler verschiedener Faktoren wie beispielsweise dem TGF- β 1 oder durch renale Hypoxie induziert, die beide durch Aktivierung von Fibroblasten die Bildung von Extrazellulärmatrix und damit die Fibrosierung auslösen können.

In dieser Arbeit sollten daher anhand von humanen renalen Fibroblastenkulturen Transporter isoliert werden, die eine Rolle bei dem Transport von Sulfat, das für die Bildung der EZM nötig ist, spielen und der Einfluss der beiden Fibrose-Induktoren TGF- β 1 und Hypoxie auf diese Transporter untersucht werden. Dabei wurde neben der Expression der Transporter SAT-1 und NaS_i-1 auf mRNA-Ebene die des SAT-1 auch auf Proteinebene untersucht. Als Marker für eine Nierenfibrose gelten eine gesteigerte α -sma-Expression und ein Verlust von E-Cadherin, deren Expression auf mRNA-Ebene in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde.

6.1 Nachweis der spezifischen mRNA von SAT-1, NaS_i-1, E-CDH und α -sma in den Zelllinien TK173 und TK188

In ersten Versuchen zu den Zelllinien und den Transportern SAT-1 und NaS_i-1 (Abb. 5.2 und Abb. 5.3), bei denen die Zelllinien für 3 Tage zum einen mit 1 ng/ml TGF- β 1 und zum anderen in Abwesenheit von TGF- β 1 inkubiert wurden, konnten in beiden Zelllinien auf mRNA-Ebene sowohl die Transporter SAT-1 als auch NaS_i-1 nachgewiesen werden. Das erzeugte Bandenmuster in der PCR zeigt die mRNA für SAT-1 bei etwa 254 bp, die von NaS_i-1 bei etwa 228 bp. Diese Längen entsprechen den unter 3.1 aufgeführten Produktlängen der verwendeten Oligonucleotidprimer für SAT-1 und NaS_i-1 und stimmen mit den Literaturdaten überein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die mRNA für die beiden Transporter in den verwendeten Zellen vorhanden und auch eine Expression der zu untersuchenden

Transporter auf Proteinebene möglich ist. Damit ist in den obigen Zelllinien erstmals der Nachweis dieser mRNA gelungen.

Das Vorhandensein von E-Cadherin-mRNA in der Zelllinie TK173 konnte, wie in Abb. 5.4 dargestellt, ebenfalls mithilfe der PCR nachgewiesen werden. Denn auch hier entspricht die Produktlänge von 583 bp dem eingesetzten Oligonucleotidprimer. In der Zelllinie TK188 war in der PCR keine Bande für E-Cadherin erkennbar. Bei der Zelllinie TK188 handelt es sich jedoch um eine Biopsie aus einer stark fibrotischen Niere, für die Studien – unabhängig von der verwendeten Zelllinie – häufig eine stark reduzierte E-Cadherin-Expression gezeigt haben (YANG und LIU 2001; ARESU et al. 2008; ZHENG et al. 2009). Es schien daher eine sensitivere Methode wie die *real-time* PCR für den genaueren Nachweis hier angebracht.

Die Expression von α -sma konnte an den Zelllinien TK173 und TK188 durch HEEG et al. bereits nachgewiesen werden (HEEG et al. 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche ergaben jedoch, trotz vorhandener Banden für GAPDH-mRNA als *housekeeping gene*, in beiden Zelllinien keinen Nachweis von α -sma. Ein möglicher und wahrscheinlicher Grund hierfür ist ein fehlerhafter oder falscher Oligonucleotidprimer, der die DNS nicht oder inkorrekt gebunden hat. Auf einen erneuten Versuch mit einem anderen Primer wurde in Anbetracht der schlüssigen Versuche von HEEG et al. verzichtet und eine Bestimmung mithilfe der sensitiveren *real-time* PCR, die im Anschluss für alle oben genannten Proteine erfolgte, konnte das Vorhandensein von α -sma-mRNA zeigen.

6.2 Einfluss von TGF- β 1 auf die Zellmorphologie sowie die mRNA-Mengen von SAT-1 und NaS_i-1

Im Rahmen der 3-tägigen Inkubation mit TGF- β 1 wurden beide Zelllinien täglich photographisch dokumentiert und ein Einfluss des Zytokins in der Konzentration von 10 ng/ml auf die Morphologie der Zellen beurteilt. Wie in 5.3.1 dargestellt, unterscheiden sich die beiden Zelllinien zunächst recht deutlich in ihrer Morphologie. Während die Zellen der Linie TK173 einen eher kugeligen Zelleib mit kurzen, dicken Ausläufern ausbilden, haben die Zellen der Linie TK188 einen schmalen und langen Zelleib mit dünnen, langgezogenen Ausläufern. Diese Formen scheinen sich auch über den Inkubationszeitraum unter TGF- β 1 kaum zu verändern. Einzig in der Kultur

der Linie TK173 nach 3 Tagen unter TGF- β 1 ist eine leichte Tendenz zur Ausbildung von langgezogenen und spitzen Zellausläufern zu beobachten.

Der fehlende Einfluss von TGF β -1 auf die Zelllinie TK188 ist gut mit dem Fakt in Einklang zu bringen, dass die Fibroblasten der Linie TK188 bereits a priori ihre maximale Ausprägung im Rahmen der Nierenfibrose erreicht haben und eine weitere morphologische Veränderung nicht stattfindet. Die Zellen der Linie TK173 hingegen scheinen ab Tag 3 unter TGF- β 1 eine beginnende morphologische Veränderung hin zum Phänotyp TK188 zu durchlaufen. Dass eine solche Veränderung möglich ist, zeigten DIHAZI et al. durch Induktion eines osmotischen Stresses auf die Zelllinie TK173 (DIHAZI et al. 2010), die sich daraufhin zu einem TK188-Phänotyp entwickelte.

Neben der phänotypischen Veränderung der Zellen interessierte vor allem die Änderung der mRNS-Menge von SAT-1 sowie NaS_i-1 unter TGF- β 1. In den PCR-Versuchen zum Nachweis der mRNS dieser beiden Transporter (Kap. 5.2.1 und 5.2.2) wurde neben dem Ansatz mit *low-glucose*-Kulturmedium bereits testweise ein Ansatz zusätzlich mit 1 ng/ml TGF- β 1 für 3 Tage inkubiert. In Abb. 5.2 und Abb. 5.3 ist zu erkennen, dass vor allem in der Expression von SAT-1-mRNS ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen in Abwesenheit von TGF- β 1 und denen, deren Medium 1 ng/ml TGF- β 1 enthielt, besteht. Die mRNS des SAT-1 scheint in beiden Zelllinien wesentlich stärker unter TGF- β 1 exprimiert zu sein als in der Kontrolle. Daneben scheint TK188 bereits in der Kontrolle wesentlich mehr SAT-1-mRNS zu exprimieren als TK173.

Für den NaS_i-1 fällt eine Reaktion auf TGF- β 1 weniger deutlich aus. Zwischen den Zellen, die ohne TGF- β 1 inkubiert wurden, und denen unter 1 ng/ml TGF- β 1 scheint innerhalb der Zelllinie kein Unterschied zu bestehen. Lediglich der Vergleich beider Zelllinien lässt eine etwas stärkere Expression der NaS_i-1-mRNS in der Zelllinie TK188 vermuten. Zur genaueren Bestimmung dieses Unterschieds, wurden Konzentrationsreihen mit 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β 1 jeweils für 3 Tage und eine anschließende quantitative Bestimmung mittels *real-time* PCR durchgeführt.

In der *real-time* PCR wird dann für SAT-1 in beiden Zelllinien ein Einfluss des TGF- β 1 deutlich (Abb. 5.6 und Abb. 5.7). Bereits nach Zugabe von 0,1 ng/ml steigt die mRNS-Menge des Transporters SAT-1 deutlich an und nimmt mit steigender

Konzentration weiter signifikant zu. Für den NaS₁-1 zeichnet sich der Einfluss des TGF-β1 – analog zu den ersten Eindrücken in der PCR – weniger deutlich ab (Abb. 5.9 und Abb. 5.10). Obwohl auch hier in der Linie TK173 ein signifikanter Anstieg der mRNA-Menge erkennbar ist, beginnt dieser jedoch erst bei höheren TGF-β1-Konzentrationen. In der Zelllinie TK188 ist zwar eine deutliche Tendenz zur Steigerung der mRNA-Menge zu erkennen, diese ist jedoch nicht signifikant.

Den gesteigerten mRNA-Mengen unter TGF-β1 nach zu urteilen, wäre es also durchaus möglich, dass SAT-1 eine Rolle im Rahmen der Fibrogenese der Nieren spielt. Als möglicher Transporter für Sulfat, der in den Fibroblasten vorhanden ist und deutlich auf den Fibrose-Induktor TGF-β1 (DENNLER et al. 2002; SATO et al. 2003) reagiert, könnte er durch seinen Sulfattransport (REGGEER et al. 2003) an der Bildung von EZM und damit Fibrogenese beteiligt sein. Für den Transporter NaS₁-1 sind große Mengen an TGF-β1 erforderlich, um eine steigende Tendenz in der mRNA-Menge zu erzeugen. Falls NaS₁-1 also über TGF-β1 induzierbar ist und in den Fibroblasten eine Rolle im Rahmen EZM-Produktion spielt, wäre es möglich, dass NaS₁-1 für seine Expression neben TGF-β1, das nur einen geringen Effekt auf die Steigerung der mRNA-Menge hat, weitere Stimuli benötigt oder über einen anderen Signalweg (Abb. 1.7) im Rahmen der EMT aktiviert wird.

6.3 Einfluss von TGF-β1 auf die mRNA-Mengen von α-sma und E-Cadherin

Unter 3-tägiger Inkubation der Zellen mit TGF-β1 in verschiedenen Konzentrationen wurden neben den Einflüssen auf die Transporter-mRNA auch die Einflüsse auf die mRNA-Mengen von α-sma und E-Cadherin untersucht, da diese als frühe Marker einer EMT gewertet werden und somit geeignet sind, den „Fibrosegrad“ der Zellen im Rahmen einer EMT zu dokumentieren.

Für α-sma lässt sich in der Zelllinie TK173 ein leichter Anstieg der mRNA-Menge ab einer Inkubation mit 1 ng/ml TGF-β1 erkennen, der durch höhere Konzentrationen sogar weiter zunimmt (Abb. 5.12). Die Unterschiede sind dabei jedoch nicht signifikant, sondern eher im Rahmen einer Tendenz zu werten. Für TK188 werden signifikant gesteigerte mRNA-Mengen von α-sma erst bei hohen Konzentrationen von TGF-β1 erkennbar (Abb. 5.13). Insgesamt besitzt die Zelllinie TK188 jedoch bereits in der Kontrolle größere Mengen an α-sma-mRNA als die Linie TK173. Diese

Ergebnisse zeigen, nach zunächst fehlgeschlagenem Nachweis in der PCR (Kap. 5.2.4), das Vorhandensein von α -sma-mRNS in beiden untersuchten Zelllinien. Da es sich bei der Linie TK188 um ein Biopsat einer bereits stark fibrotischen Niere handelt, in der die α -sma-Expression Studien zufolge schon hoch ist (HEEG et al. 2005), scheint es wenig verwunderlich, dass die mRNS-Menge durch TGF- β 1 nicht unendlich ansteigen kann. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Desensibilisierung der TGF- β 1-Rezeptoren durch hohe TGF- β 1-Konzentrationen in vivo. GENG et al. konnten in proximalen Nierentubuluszellen Änderungen des TGF- β 1-Einflusses durch Veränderung des Rezeptors bzw. veränderte Smad7-Expression beschreiben (GENG et al. 2009). Dass beide Zelllinien über TGF- β 1-Rezeptoren verfügen, konnte bereits in Studien gezeigt werden (SCHÜTTERT et al. 2003). Die Zellen der Linie TK173 – die nur eine Tendenz zur gesteigerten mRNS-Bildung erkennen ließen – könnten aufgrund der Tatsache, dass sie gesundem Nierengewebe entstammen, resistenter gegen die Einflüsse von TGF- β 1 in kleineren Konzentrationen sein und daher erst bei höheren Konzentration von TGF- β 1 eine mRNS-Steigerung von α -sma zeigen.

Das E-Cadherin als Zellverbandsmarker intakter Epithelstrukturen stellt einen guten Parameter für die Auflösung von Zellverbänden, beispielsweise im Rahmen einer EMT dar (YANG und LIU 2001). Die Einflüsse des TGF- β 1 auf die Expression von E-Cadherin und die intrazellulären Mechanismen sind bereits beschrieben worden (VOGELMANN et al. 2005). In dieser Arbeit sollten die Einflüsse anhand der vorliegenden Fibroblastenpopulation auf mRNS-Ebene untersucht werden. In der Zelllinie TK173 wird deutlich, dass bereits sehr geringe Konzentrationen an TGF- β 1 ausreichend sind, um die mRNS-Menge von E-Cadherin signifikant zu senken (Abb. 5.15). Bei Inkubation mit 10 ng/ml TGF- β 1 konnten in der *real-time* PCR nur noch verschwindend geringe Mengen an E-Cadherin-mRNS detektiert werden. Die Zelllinie TK188, als fibrotisches Pendant, zeigte bereits unter der Kontrolle sehr geringe mRNS-Mengen an E-Cadherin, die bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml TGF- β 1 signifikant abgefallen war (Abb. 5.16). Unter Konzentrationen von 1,0 und 10 ng/ml TGF- β 1 konnte bei der gewählten Zyklenzahl von 47 in der *real-time* PCR kein Signal mehr detektiert werden, was bei ansonsten problemfreiem Versuchsablauf durchaus einem Verlust der E-Cadherin-Produktion gleichzusetzen ist. Es konnte also gezeigt werden, dass E-Cadherin-mRNS in beiden Zelllinien

vorhanden ist und dass TGF- β 1 Zellverbände aufzulösen vermag, so dass kein E-Cadherin mehr nachweisbar ist.

6.4 Einfluss von Hypoxie auf die mRNA-Mengen von SAT-1 und NaS_i-1

Um den Einfluss von Hypoxie auf die mRNA-Mengen von SAT-1 und NaS_i-1 zu untersuchen, wurden beide Zelllinien jeweils unter hypoxischen (1% O₂) und als Kontrolle in normoxischen (21% O₂) Bedingungen inkubiert. Die mRNA-Bestimmungen wurden dabei nach 0, 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden durchgeführt. Dabei zeigt die Zelllinie TK173 in den ersten Stunden wenig Veränderung der mRNA-Menge für SAT-1 unter Hypoxie. Erst ab etwa 6 Stunden Inkubationsdauer lässt sich eine leichte Zunahme der mRNA für SAT-1 in der hypoxischen Zelllinie erkennen, die nach 24 Stunden dann signifikant wird (Abb. 5.18). In der Zelllinie TK188 scheint der Einfluss der Hypoxie bereits nach 6 Stunden die mRNA-Menge für SAT-1 deutlich zu steigern und erreicht auch hier nach 24 Stunden dann einen signifikanten Unterschied (Abb. 5.19). Die Zelllinie TK188, die bereits unter normoxischen Bedingungen mehr SAT-1-mRNA zu exprimieren scheint als TK173 (Abb. 5.20), reagiert also sensitiver auf die Hypoxie mit einer Steigerung der mRNA für SAT-1. Die Tatsache, dass in der „fibrotischen“ Zelllinie TK188 wesentlich mehr SAT-1-mRNA vorliegt als in der „gesunden“ Zelllinie TK173, lässt vermuten, dass SAT-1 durchaus eine Relevanz im fibrotischen Prozess der Niere hat und somit wahrscheinlich einen relevanten Transporter für Sulfat darstellt und durch Hypoxie induzierbar ist.

Für den NaS_i-1 zeigt sich unter der Inkubation in Hypoxie in der Zelllinie TK173 eine leichte Zunahme der mRNA-Menge für NaS_i-1, die in der Folge weiter deutlich sichtbar, wenn auch nicht signifikant, zunimmt (Abb. 5.21). Die Variationen in der mRNA-Menge des Transporters unter Normoxie spiegeln sehr wahrscheinlich Variationen in der Aussaat, im Wachstum und in der Handhabung der Zellen wider. In der Zelllinie TK188 zeigt sich zu Beginn der Inkubation in Hypoxie zunächst ein Abfall der mRNA-Menge für NaS_i-1, der etwa 4 Stunden lang anhält, wobei die mRNA-Menge dann kontinuierlich ansteigt, bis nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erreicht wird. Der vorübergehende Abfall der mRNA-Menge könnte auf eine verzögerte Adaptation der Zelllinie TK188 an die Hypoxie

zurückzuführen sein. Dennoch scheint die Hypoxie bereits nach etwa 4 Stunden auf die Zellen als Induktor für eine NaS_i-1-mRNS-Produktion zu wirken (Abb. 5.22).

Ähnlich wie die mRNS des SAT-1, reagiert auch die mRNS des NaS_i-1 mit einer Zunahme auf Hypoxie. Da auch hier die mRNS-Menge von NaS_i-1 in der fibrotischen Niere, also Linie TK188, bereits in der Kontrolle zu Beginn höher ist als in der Linie TK173, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass NaS_i-1 eine Rolle in der Fibrosierung der Niere zukommt und der Transporter somit am Sulfattransport im Rahmen der EZM-Produktion beteiligt sein könnte.

Eine Induktion der mRNS-Expression für SAT-1 und NaS_i-1 unter Hypoxie konnte somit für beide Zelllinien gezeigt werden.

6.5 Einfluss von Hypoxie auf die mRNS-Mengen von α -sma und E-Cadherin

Neben den Transportern sollte der Einfluss der Hypoxie auch auf die mRNS-Mengen von α -sma und E-Cadherin untersucht werden, um Veränderungen in den Zell-Zell-Kontakten zu dokumentieren. Dazu wurden beide Zelllinien sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch unter normoxischen Bedingungen für 2, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden inkubiert.

Es kann dabei in der Zelllinie TK173 bereits nach 2 Stunden im Vergleich zur Kontrolle ein erster leichter Anstieg der mRNS-Menge für α -sma detektiert werden, der sich kontinuierlich fortsetzt und nach 12 bzw. 24 Stunden signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ist (Abb. 5.24). In der Zelllinie TK188 lässt sich zunächst unter hypoxischer Inkubation kein Unterschied zur Kontrolle erkennen. Nach 6-stündiger Inkubation ist dann ein Anstieg der mRNS-Menge für α -sma sichtbar und auch diese wird nach 12 bzw. 24 Stunden signifikant größer als in der Kontrolle (Abb. 5.25). Der Einfluss von Hypoxie im Sinne einer Steigerung der mRNS-Produktion von α -sma ist deutlich und steht somit im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Studien, die unter Hypoxie eine Steigerung der mRNS-Menge postulieren (MANOTHAM et al. 2004b; SUN S et al. 2009). Die unterschiedlichen Reaktionen beider Zelllinien könnten erneut auf die unterschiedliche Herkunft und das Fibrorestadium der Zelllinien zurückzuführen sein. Während TK173 bezogen auf die mRNS-Produktion von SAT-1 und NaS_i-1 weniger sensitiv auf Hypoxie zu reagieren scheint, ist die Reaktion auf Hypoxie für α -sma deutlicher. Die Zellen der Linie TK173 reagieren

zeitnah auf die Hypoxie mit einem zunächst geringen Anstieg der mRNA-Mengen für α -sma, der nach 12 Stunden signifikant wird, während die Zellen der Linie TK188, die bereits in der Kontrolle höhere mRNA-Mengen haben, dagegen bereits stark fibrosiert und daher nicht mehr so sensitiv für Hypoxie und α -sma-Expression sind. Hiermit in Einklang würde stehen, dass die Expression von α -sma als frühes Zeichen einer Fibrosierung bzw. EMT gewertet wird (YANG und LIU 2001; KALLURI und WEINBERG 2009; LIU Y 2010). Da die TK188-Zellen als fibrotisch einzustufen sind, ist es nicht verwunderlich, dass keine Änderungen der α -sma-mRNA-Menge mit zunehmender Hypoxiedauer zu detektieren waren. Die Zelllinie TK173 hingegen, die als nicht-fibrotisch beschrieben wird, reagiert deshalb mit einer Zunahme der α -sma-mRNA-Menge unter zunehmender Hypoxiedauer. Die Reaktion auf Hypoxie unterscheidet sich damit im Bezug auf die Zelllinien nicht von denen unter TGF β -1-Inkubation, wo ebenfalls die Zelllinie TK173 deutlicher mit einer Steigerung der mRNA-Menge reagiert als TK188. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die heterogene mRNA-Steigerung beider Zelllinien auf ihre unterschiedlichen Fibrosestadien zurückzuführen ist. Analog dazu sind auch die Änderungen der mRNA-Menge für E-Cadherin zu werten.

Für E-Cadherin zeigte sich in der Zelllinie TK173 unter Hypoxie zunächst ein Anstieg der mRNA-Menge von E-Cadherin in den ersten Stunden, der sich jedoch bereits nach etwa 9 Stunden umkehrt und nach 24 Stunden bereits signifikant weniger mRNA des E-Cadherin im Gegensatz zur Kontrolle vorliegt (Abb. 5.27). In der Zelllinie TK188, in der bereits zu Beginn wesentlich weniger mRNA des E-Cadherins vorliegt als in der Linie TK173 (Abb. 5.29), setzt bereits nach zwei Stunden eine deutliche Abnahme der E-Cadherin-mRNA ein, die nach 6 Stunden signifikant wird und dann weiter abnimmt (Abb. 5.28). Die Abnahme der mRNA-Menge von E-Cadherin unter Hypoxie, die bereits in Studien beschrieben wurde (ESTEBAN et al. 2006; ZENG et al. 2008; SUN S et al. 2009), kann somit bestätigt werden. Der vorübergehende Anstieg der mRNA-Menge in der Linie TK173 ist vermutlich darin zu suchen, dass die „gesunde“ Zelllinie TK173 zunächst noch über Mechanismen der Hypoxie-Abwehr verfügen könnte, die durch eine gesteigerte Expression von E-Cadherin einen stärkeren Zellzusammenhalt vermitteln und somit der Hypoxie entgegenwirken. Nach längerer Zeit unter Hypoxie jedoch scheint dieser Mechanismus nicht mehr standzuhalten und die mRNA-Menge von E-Cadherin

nimmt ab. Die Vorschädigung der Zelllinie TK188 scheint dagegen bereits zu einem Verlust der Hypoxie-Resistenz geführt zu haben, so dass die Hypoxie sofort zu einem weiteren Verlust des Zellzusammenhaltes führt.

Der Einfluss von Hypoxie im Sinne einer Zunahme der mRNA-Menge von α -sma konnte somit für beide Zelllinien bestätigt werden, ebenso konnte die Abnahme der mRNA-Menge von E-Cadherin unter Hypoxie für beide Zelllinien nachgewiesen werden.

6.6 Einfluss von Hypoxie auf die Proteinmenge von SAT-1 und die [³⁵S]Sulfataufnahme

Wie in Kap. 5.5 dargestellt, konnte das Protein SAT-1 in den beiden Zelllinien eindeutig bei knapp über 70 kDa nachgewiesen werden (Abb. 5.30). Das Protein SAT-1 mit einer Größe von 701 Aminosäuren hat eine errechnete Masse von 77 kDa und ist daher mit der erzeugten Bande im Western Blot sehr gut zu erklären. Densitometrisch war jedoch kein Hinweis auf eine unterschiedliche Expression zwischen beiden Zelllinien im Hinblick auf eine hypoxische Inkubation zu erkennen, obwohl die Bestimmung der einzusetzenden Mengen sehr genau mithilfe der Proteinbestimmung durchgeführt wurde und nicht, wie in vielen Fällen, auf die eingesetzte Zellzahl bezogen, was aufgrund unterschiedlicher Wachstumstendenzen der Zellen und verschiedenen Ablöseverhaltens sehr ungenau gewesen wäre. Mögliche Ursachen für dieses Ergebnis könnten in einem negativen Einfluss auf die Translation durch zu starke Hypoxie zu suchen sein. Die Steigerung der mRNA-Menge durch Hypoxie könnte nämlich durch verlangsamte Translation unter hypoxischen Bedingungen einer längeren Latenz bis zu Expression des Proteins bedürfen. Hierfür würde auch der fehlende Unterschied zwischen TK173 und TK188 sprechen, der in der mRNA-Menge vorhanden ist, im Western Blot jedoch nicht zutage tritt. Dass Hypoxie in vielen Zellen zu einer globalen Verlangsamung der Translation über eine Hemmung des *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) führt, konnten LIU et al. zeigen (LIU L et al. 2006). Zusätzlich könnte der fibrotische Phänotyp der TK188-Zellen eine Auswirkung auf Translation bzw. deren Hypoxietoleranz haben und die Proteinexpression gegenüber TK173 verlangsamt oder ineffizienter sein, was den fehlenden Unterschied zwischen beiden Zelllinien erklären könnte.

Obwohl unter hypoxischen Bedingungen eine Zunahme der SAT-1-mRNS-Expression zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, konnte im Western Blot keine erhöhte Proteinmenge detektiert werden. Zur Absicherung dieser Daten sollte zusätzlich die Aufnahme von Sulfat in diese Zellen gemessen werden. Im Rahmen dieser Sulfataufnahme (Abb. 5.31) zeigte sich dann ebenfalls, trotz nachgewiesener Zunahme der mRNS beider Transporter unter Hypoxie, für die Proteinfunktion keine erhöhte Sulfataufnahme unter Hypoxie. Während TK188 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mehr mRNS beider Transporter ausbildet als die Zelllinie TK173, war in den Aufnahmeversuchen kaum ein Unterschied zwischen beiden Zelllinien zu erkennen. Die Sulfataufnahme unter Hypoxie war bei allen Versuchsbedingungen sogar niedriger als unter Normoxie, was ebenfalls im Gegensatz zu der Steigerung der mRNS-Menge beider Transporter unter Hypoxie steht. Es gilt darüber hinaus bei den Ergebnissen der Sulfataufnahme zu beachten, dass die Konstellation „Natrium-frei + DIDS“ im Aufnahmemedium im Normalfall zu einer Hemmung des Sulfattransports in beiden Transportern führt und damit ein Maß für die Diffusion des Sulfats in die Zelle oder den Transport über andere Proteine darstellt. Da die Werte für die Sulfataufnahme auch unter dieser Versuchsbedingung nahezu gleich mit der aufgenommenen Menge unter Hemmstoff-freiem Medium ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich in allen Fällen nicht um eine durch SAT-1- oder NaS_i-1-vermittelte Sulfataufnahme, sondern am ehesten um Diffusion handelt. Ein weiteres Indiz hierfür ist auch die aufgenommene Menge Sulfat, die sich als insgesamt sehr niedrig darstellt. Es bleibt also festzuhalten, dass, trotz steigender mRNS-Mengen für beide Transporter unter Hypoxie und ausreichender mRNS-Mengen unter Normoxie, kein funktionelles SAT-1-Protein nachgewiesen werden kann. Es gibt mehrere mögliche Ursachen für diese Diskrepanz zwischen mRNS-Menge und Proteinexpression bzw. -funktion. Die wahrscheinlichste Ursache für die fehlende Proteinfunktion unter Hypoxie scheint ein Verlust der Zellviabilität bzw. ein Funktionsverlust der Proteine zu sein.

Die Hypoxie wurde mit 1% bewusst niedrig gewählt, da die Regionen der Niere, denen das Biopsat entstammt, mit Sauerstoffpartialdrücken von bis zu 10 mmHg (MANOTHAM et al. 2005) bereits über eine gewisse Hypoxietoleranz verfügen sollten. Allerdings scheint die gewählte Hypoxie dennoch zu stark für die verwendeten Zelllinien gewesen zu sein. Weiterhin konnte während der

Aufnahmeversuche trotz vorsichtigen Waschens der Zellen eine Ablösung großer Teile sowohl der hypoxischen als auch der normoxischen Zellen nicht verhindert werden, so dass nur sehr kleine Proteinmengen für die Versuche zur Verfügung standen.

In Versuchen zum Einfluss von Nikotin auf das Gehirn konnten SUN et al. ein Phänomen beobachten, bei dem die mRNA-Menge für das untersuchte Protein ebenfalls signifikant anstieg, ein Einfluss auf die Proteinmenge jedoch ausblieb (SUN D et al. 2007). Hier wurden mögliche Einflüsse auf die Translation im Sinne von Translationsfaktoren oder einer posttranslationalen Proteindegradation postuliert. Ebenso detektierten RAJAKUMAR und CONRAD in der menschlichen Plazenta unter physiologischen Bedingungen eine Zunahme von HIF-2 α -mRNA mit Zunahme des Gestationsalters, jedoch analog dazu eine Abnahme der HIF-2 α -Proteinmenge. Eine Erklärung für diese Ergebnisse konnten die Autoren nicht liefern (RAJAKUMAR und CONRAD 2000). Aber auch im Falle des Einflusses von Hypoxie auf TK173 und TK188 scheint ein Einfluss auf Translationsebene eine mögliche Ursache, wie bereits in der Diskussion zum Western Blot erwähnt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Translation infolge von Hypoxie stark global verlangsamt ist. Im Schnitt werden 16 Stunden Latenz für eine erste schwache translationale Reaktion auf Hypoxie beschrieben und die Proteinproduktion wurde mit ca. 50% ihrer normalen Geschwindigkeit gemessen. Die Ursache dafür scheint dabei im sparsamen Umgang der Zelle mit dem lebenswichtigen ATP zu liegen (LIU L et al. 2006; SPRIGGS et al. 2008).

Die genannten Möglichkeiten erklären die verminderte Sulfataufnahme bzw. fehlende Transporterfunktion unter Hypoxie. Jedoch bleibt zu diskutieren, warum auch bei den Zellen unter Normoxie lediglich ein Sulfattransport auf Diffusionsniveau erzielt werden konnte. Hier kommen ähnliche Ursachen infrage. Zum einen wäre es theoretisch vorstellbar, dass die Expression der Transporter auf Translationsebene eines Cofaktors bedarf, der in der Zellkultur nicht vorlag und daher entweder zu fehlender Translation oder posttranslationaler Proteindegradation geführt hat, wahrscheinlicher scheint es jedoch zu sein, dass durch die mangelnde Adhäsion der Zellen an die Kulturschalen, die unter Hypoxie schlechter als unter Normoxie ausgeprägt ist, die Zellen bereits in den Waschvorgängen nahezu vollständig abgewaschen oder so geschädigt wurden, dass eine Sulfataufnahme nur noch per

diffusionem in die wenigen vorhandenen, aber geschädigten Zellen, detektiert werden konnte. Die im Vergleich höhere Aufnahme von [³⁵S]Sulfat in der Linie TK173 im Aufnahmemedium, das Natrium enthielt und DIDS-frei war, würde ebenfalls für diese Argumentation sprechen. Hier transportierten sowohl NaS_i-1 als auch SAT-1 das [³⁵S]Sulfat und zusätzlich waren die Zellen nicht durch die starke Hypoxie vorgeschädigt. Dadurch verfügten die normoxischen, wie sich auch während der anderen Versuche zeigte, über bessere Adhäsionseigenschaften im Vergleich zu den hypoxisch inkubierten Zellen.

Insgesamt scheinen zwei Faktoren die Diskrepanz zwischen mRNA-Menge und Proteinmenge und -funktion zu erklären. Der fehlende Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie auf Proteinebene, also im Western Blot, ist durch die verlangsamte Translationsgeschwindigkeit mit einer in Studien postulierten Latenz von bis zu 16 Stunden und auch nur 50% Effizienz der Translation durchaus schlüssig erklärbar. Die fehlende Funktion der Transporter im Sulfataufnahme-Versuch hingegen scheint neben einer vermutlich fehlenden Hochregulation des Proteins aufgrund zu großer Translationslatenz vor allem in einer mangelnden Zellviabilität, zu starker Ablösung der Zellen und nachfolgender minimaler, vermutlich auch geschädigter, Zell- bzw. Proteinmengen zu liegen.

6.7 Ausblick und Schlussfolgerung

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse ergibt sich weiterer Forschungsbedarf im Hinblick auf den Einfluss von Hypoxie auf die Transporterexpression und -funktion. Die Zellen sollten in diesem Fall zunächst mit weniger starker Hypoxie inkubiert werden. Außerdem sollte einer eventuell verzögerten Translation Rechnung getragen werden, indem die Zellen ausreichend lange in Hypoxie inkubiert werden bzw. nach hypoxischer Episode die Zeit erhalten, entsprechend Protein zu bilden. Im Rahmen der [³⁵S]Sulfat-Aufnahmeversuche müsste nach Möglichkeiten zur besseren Zelladhäsion der verwendeten Zellen gesucht werden, um ein Abspülen der Zellen zu verhindern. Die Verwendung eines Viabilitätstests im Zusammenhang mit den [³⁵S]Sulfat-Aufnahmeversuchen könnte einen Hinweis über die Menge der avitalen Zellen geben.

7 Zusammenfassung

Die Nierenfibrose als Folgeerkrankung verschiedenster Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus und arteriellem Hypertonus beruht auf einer Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM) durch Fibroblasten. Dabei stellt Sulfat einen elementaren Baustein der EZM in Form der Glykosaminoglykane dar. Bisher ungeklärt ist die Frage, wie das hydrophile Sulfat von den Fibroblasten aufgenommen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die mRNA-Mengen der Sulfattransporter SAT-1 und NaS₁-1 sowie das Protein SAT-1 untersucht und mit den bekannten Fibroseinduktoren TGF- β 1 und Hypoxie versucht, eine Änderung der mRNA-Menge bzw. Proteinexpression der beiden Transporter zu erzielen.

In den verwendeten Fibroblastenzelllinien TK173 und TK188 konnten beide Transporter zunächst nachgewiesen werden und es zeigte sich sowohl unter TGF- β 1 als auch Hypoxie ein Effekt im Sinne einer Steigerung der mRNA-Menge beider Transporter. Für die Zelllinie TK173, die eine nicht-fibrotische Fibroblastenlinie darstellt, konnten in allen Versuchen regelmäßig niedrigere mRNA-Mengen der Transporter detektiert werden als in der als fibrotisch bekannten Zelllinie TK188. Eine Beteiligung dieser beiden Transporter am Sulfattransport im Rahmen der Nierenfibrose scheint daher wahrscheinlich. Unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen konnte in dieser Arbeit auf Proteinebene der Transporter SAT-1 zwar nachgewiesen werden (Antikörper zum Nachweis von NaS₁-1 waren zum Versuchszeitpunkt nicht erhältlich), jedoch konnten hierbei keine zufriedenstellenden Ergebnisse hinsichtlich der SAT-1-Expression erzielt werden, was auf eine zu stark gewählte Hypoxie (1% O₂) bzw. verlangsamte Translation unter Hypoxie zurückzuführen sein könnte. Im anschließenden [³⁵S]Sulfat-Aufnahmeversuch konnten, bei vermutlich stark geschädigter Zellstruktur bzw. verminderter Zellviabilität, unter Hypoxie eher verminderte [³⁵S]Sulfat-Aufnahmen über SAT-1 und NaS₁-1 detektiert werden.

Neben SAT-1 und NaS₁-1 wurden auch die Fibroseparameter α -sma und E-Cadherin untersucht. Dabei konnte, wie in diversen Studien bereits gezeigt, auch in beiden hier verwendeten Zelllinien bestätigt werden, dass TGF- β 1 und Hypoxie zu einer Steigerung der mRNA-Menge von α -sma – als Marker für Myofibroblasten – führt, während sie die mRNA-Menge von E-Cadherin – als epitheliale Zellverbandsmarker – signifikant senken.

8 Literaturverzeichnis

- Aresu L, Rastaldi MP, Pregel P, Valenza F, Radaelli E, Scanziani E, Castagnaro M (2008). Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. *Virchows Arch* 453, 617-25.
- Bästlein C, Burckhardt G (1986). Sensitivity of rat renal luminal and contraluminal sulfate transport systems to DIDS. *Am J Physiol* 250, F226-34.
- Beck L, Markovich D (2000). The mouse Na(+)-sulfate cotransporter gene *Nas1*. Cloning, tissue distribution, gene structure, chromosomal assignment, and transcriptional regulation by vitamin D. *J Biol Chem* 275, 11880-90.
- Brezis M, Rosen S (1995). Hypoxia of the renal medulla - its implications for disease. *N Engl J Med* 332, 647-55.
- Brosnan JT, Brosnan ME (2006). The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 136, 1636S-1640S.
- Busch AE, Waldegger S, Herzer T, Biber J, Markovich D, Murer H, Lang F (1994). Electrogenic cotransport of Na⁺ and sulfate in *Xenopus* oocytes expressing the cloned Na⁺SO₄(2⁻) transport protein NaSi-1. *J Biol Chem* 269, 12407-9.
- Cole DE, Scriver CR (1980). Age-dependent serum sulfate levels in children and adolescents. *Clin Chim Acta* 107, 135-9.
- David C, Ullrich KJ (1992). Substrate specificity of the luminal Na(+)-dependent sulphate transport system in the proximal renal tubule as compared to the contraluminal sulphate exchange system. *Pflugers Arch* 421, 455-65.
- Dawson PA, Beck L, Markovich D (2003). Hyposulfatemia, growth retardation, reduced fertility, and seizures in mice lacking a functional NaSi-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13704-9.
- Dawson PA, Russell CS, Lee S, McLeay SC, van Dongen JM, Cowley DM, Clarke LA, Markovich D (2010). Urolithiasis and hepatotoxicity are linked to the anion transporter *Sat1* in mice. *J Clin Invest* 120, 706-12.
- de Larco JE, Todaro GJ (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4001-5.
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 71, 731-40.
- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-84.
- Dihazi H, Dihazi GH, Müller C, Lahrichi L, Asif AR, Bibi A, Eltoweissy M, Vasko R, Müller GA (2010). Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor. *J Proteomics* 74, 304-18.
- Eddy AA (2000). Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15, 290-301.
- Elberg G, Chen L, Elberg D, Chan MD, Logan CJ, Turman MA (2008). MKL1 mediates TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F1116-28.
- Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval R, O'Brien T S, Maxwell PH (2006). Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 66, 3567-75.

- Fine LG, Bandyopadhyay D, Norman JT (2000). Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int Suppl* **75**, S22-6.
- Fink L, Kinfe T, Seeger W, Ermert L, Kummer W, Bohle RM (2000). Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation. *Am J Pathol* **157**, 1459-66.
- Fredriksson R, Nordstrom KJ, Stephansson O, Hagglund MG, Schioth HB (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett* **582**, 3811-6.
- Frei U, Schober-Halstenberg H-J. (2008). "Jahresbericht 2006/2007 Nierenersatztherapie in Deutschland." Jahresbericht, abgerufen am 10.02.2011, von http://www.bundesverband-niere.de/files/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf.
- Geng H, Lan R, Wang G, Siddiqi AR, Naski MC, Brooks AI, Barnes JL, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA (2009). Inhibition of autoregulated TGFbeta signaling simultaneously enhances proliferation and differentiation of kidney epithelium and promotes repair following renal ischemia. *Am J Pathol* **174**, 1291-308.
- Gown AM (1990). The mysteries of the myofibroblast (partially) unmasked. *Lab Invest* **63**, 1-3.
- Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK (1997). A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J Biol Chem* **272**, 10948-56.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction. Pflugers Arch* **447**, 465-8.
- Heeg MH, Koziolk MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Müller GA, Strutz F (2005). The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* **68**, 96-109.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-94.
- Hierholzer K, Cade R, Gurd R, Kessler R, Pitts R (1960). Stop-flow analysis of renal reabsorption and excretion of sulfate in the dog. *Am J Physiol* **198**, 833-7.
- Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH (2008). Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle* **7**, 1128-32.
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, et al. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **117**, 3810-20.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-30.
- Hoglund PJ, Nordstrom KJ, Schioth HB, Fredriksson R (2010). The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Mol Biol Evol* **28**, 1531-41.
- Hulpiau P, van Roy F (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 349-69.

- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110, 341-50.
- Järveläinen H, Sainio A, Koulou M, Wight TN, Penttinen R (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61, 198-223.
- Kalluri R, Neilson EG (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-84.
- Kalluri R, Zeisberg M (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-8.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93, 1074-81.
- Kida Y, Asahina K, Teraoka H, Gitelman I, Sato T (2007). Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *J Histochem Cytochem* 55, 661-73.
- Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S, Bauer C: *Lehrbuch der Physiologie*; Thieme, Stuttgart 2005, 332.
- Krick W, Schnedler N, Burckhardt G, Burckhardt BC (2009). Ability of sat-1 to transport sulfate, bicarbonate, or oxalate under physiological conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F145-54.
- Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8263-7.
- Lawrence DA (2001). Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem* 219, 163-70.
- Lee A, Markovich D (2004). Characterization of the human renal Na(+)-sulfate cotransporter gene (NAS1) promoter. *Pflugers Arch* 448, 490-9.
- Lee A, Beck L, Markovich D (2000). The human renal sodium sulfate cotransporter (SLC13A1; hNaSi-1) cDNA and gene: organization, chromosomal localization, and functional characterization. *Genomics* 70, 354-63.
- Lin JH, Levy G (1983). Renal clearance of inorganic sulfate in rats: effect of acetaminophen-induced depletion of endogenous sulfate. *J Pharm Sci* 72, 213-7.
- Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 21, 521-31.
- Liu Y (2010). New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 212-22.
- Lücke H, Stange G, Murer H (1979). Sulphate-ion/sodium-ion co-transport by brush-border membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Biochem J* 182, 223-9.
- Lücke H, Stange G, Murer H (1981). Sulfate-sodium cotransport by brush-border membrane vesicles isolated from rat ileum. *Gastroenterology* 80, 22-30.
- Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR (1971). Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173, 548-50.

- Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M (2004a). Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 15, 1277-88.
- Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR, Nangaku M (2004b). Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int* 65, 871-80.
- Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M (2005). A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney Int* 67, 1428-39.
- Markovich D (2001). Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiol Rev* 81, 1499-533.
- Markovich D, Murer H (2004). The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch* 447, 594-602.
- Markovich D, Aronson PS (2007). Specificity and regulation of renal sulfate transporters. *Annu Rev Physiol* 69, 361-75.
- Markovich D, Forgo J, Stange G, Biber J, Murer H (1993). Expression cloning of rat renal Na⁺/SO₄⁽²⁻⁾ cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8073-7.
- Markovich D, Bissig M, Sorribas V, Hagenbuch B, Meier PJ, Murer H (1994). Expression of rat renal sulfate transport systems in *Xenopus laevis* oocytes. Functional characterization and molecular identification. *J Biol Chem* 269, 3022-6.
- Marrs JA, Nelson WJ (1996). Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol* 165, 159-205.
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-91.
- Massague J, Wotton D (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19, 1745-54.
- Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M (2004). Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 15, 1574-81.
- Mohamet L, Hawkins K, Ward CM (2010). Loss of function of e-cadherin in embryonic stem cells and the relevance to models of tumorigenesis. *J Oncol* 2011, 352616.
- Nangaku M (2006). Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17, 17-25.
- Nollet F, Kools P, van Roy F (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299, 551-72.
- Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG (1997). Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273, F563-74.
- Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG (2000). Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* 58, 587-97.
- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C (2003). The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14, 33-43.

- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* 18, 1738-47.
- Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME (2006). The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J* 393, 601-7.
- Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 99, 1375-9.
- Rajakumar A, Conrad KP (2000). Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod* 63, 559-69.
- Rasmussen R: Quantification on the LightCycler; in: Rapid cycle real-time PCR, methods and applications; hrsg. v. Meuer SC, Wittwer C, Nakagawara K; Springer Press, Heidelberg, Deutschland 2001, 21-34.
- Rassow J: Lehrbuch der Biochemie; Thieme, Stuttgart 2006.
- Regeer RR, Lee A, Markovich D (2003). Characterization of the human sulfate anion transporter (hsat-1) protein and gene (SAT1; SLC26A1). *DNA Cell Biol* 22, 107-17.
- Sabry ZI, Shadarevian SB, Cowan JW, Campbell JA (1965). Relationship of dietary intake of sulphur amino-acids to urinary excretion of inorganic sulphate in man. *Nature* 206, 931-3.
- Sandner P, Hofbauer KH, Tinel H, Kurtz A, Thiesson HC, Ottosen PD, Walter S, Skott O, Jensen BL (2004). Expression of adrenomedullin in hypoxic and ischemic rat kidneys and human kidneys with arterial stenosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R942-51.
- Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 112, 1486-94.
- Satoh H, Susaki M, Shukunami C, Iyama K, Negoro T, Hiraki Y (1998). Functional analysis of diastrophic dysplasia sulfate transporter. Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans. *J Biol Chem* 273, 12307-15.
- Schütter JB, Liu MH, Gliem N, Fiedler GM, Zopf S, Mayer C, Müller GA, Grunewald RW (2003). Human renal fibroblasts derived from normal and fibrotic kidneys show differences in increase of extracellular matrix synthesis and cell proliferation upon angiotensin II exposure. *Pflugers Arch* 446, 387-93.
- Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS (1993). Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4166-70.
- Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ (1990). Chromosomal localization of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet* 47, 802-7.
- Semenza GL (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88, 1474-80.
- Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, Jr., Scott RE, Moses HL (1986). Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res* 46, 2068-71.

- Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE (2008). Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100, 27-38.
- Strutz F, Neilson EG (1994). The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl* 45, S106-10.
- Strutz F, Müller GA (2006). Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant* 21, 3368-70.
- Strutz F, Zeisberg M (2006). Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2992-8.
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130, 393-405.
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Müller G (2001). TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59, 579-92.
- Sun D, Huang W, Hwang YY, Zhang Y, Zhang Q, Li MD (2007). Regulation by nicotine of Gpr51 and Ntrk2 expression in various rat brain regions. *Neuropsychopharmacology* 32, 110-6.
- Sun S, Ning X, Zhang Y, Lu Y, Nie Y, Han S, Liu L, Du R, Xia L, He L, et al. (2009). Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int* 75, 1278-87.
- Takeichi M (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75, 464-74.
- Tallgren LG (1980). Inorganic sulphates in relation to the serum thyroxine level and in renal failure. *Acta Med Scand Suppl* 640, 1-100.
- Turner RJ (1984). Sodium-dependent sulfate transport in renal outer cortical brush border membrane vesicles. *Am J Physiol* 247, F793-8.
- Ullrich KJ, Rumrich G, Kloss S (1984). Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney. I. Kinetics, effects of K⁺, Na⁺, Ca²⁺, H⁺, and anions. *Pflugers Arch* 402, 264-71.
- van Roy F, Berx G (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65, 3756-88.
- Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A (2005). TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* 118, 4901-12.
- Wakefield LM, Smith DM, Broz S, Jackson M, Levinson AD, Sporn MB (1989). Recombinant TGF-beta 1 is synthesized as a two-component latent complex that shares some structural features with the native platelet latent TGF-beta 1 complex. *Growth Factors* 1, 203-18.
- Wang GL, Semenza GL (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270, 1230-7.
- Willis BC, Borok Z (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L525-34.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341-7.

- Yang J, Liu Y (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465-75.
- Zeisberg M, Maeshima Y, Mosterman B, Kalluri R (2002). Renal fibrosis. Extracellular matrix microenvironment regulates migratory behavior of activated tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 160, 2001-8.
- Zeng R, Yao Y, Han M, Zhao X, Liu XC, Wei J, Luo Y, Zhang J, Zhou J, Wang S, et al. (2008). Biliverdin reductase mediates hypoxia-induced EMT via PI3-kinase and Akt. *J Am Soc Nephrol* 19, 380-7.
- Zhang SX, Gozal D, Sachleben LR, Jr., Rane M, Klein JB, Gozal E (2003). Hypoxia induces an autocrine-paracrine survival pathway via platelet-derived growth factor (PDGF)-B/PDGF-beta receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in RN46A neuronal cells. *FASEB J* 17, 1709-11.
- Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT, Min D, Succar L, Rangan GK, Hu M, Henderson BR, et al. (2009). Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 175, 580-91.
- Zuk A, Matlin KS, Hay ED (1989). Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. *J Cell Biol* 108, 903-19.

Danksagung

Frau Professor Dr. phil. nat. Burckhardt danke ich herzlich für die Bereitstellung dieses Themas, die freundliche und engagierte Betreuung sowie die vielen guten Ideen und den unermüdlichen Einsatz für den Erfolg dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Burckhardt danke ich für die wertvollen fachlichen Hinweise, ebenso wie für die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich auch Frau Dr. oec. troph. Nina Schnedler für die Unterstützung bei allen Problemen sowie die großartige Hilfe bei den Western Blots und Aufnahmeversuchen danken.

Herrn Professor Dr. med. Müller sowie Herrn PD Dr. rer. nat. Dihazi aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die Bereitstellung des Zellmaterials und für die nützlichen Hinweise zum Umgang mit den Zellen.

Frau Professor Dr. rer. nat. Katschinski und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die freundliche Erlaubnis, die Laborgeräte des Instituts nutzen zu dürfen, ebenso für die Einweisung und Hilfestellung bei deren Benutzung.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktorandinnen und Doktoranden der Abteilung für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich herzlich für die unermüdliche Unterstützung und die unzähligen guten Hinweise. Ganz besonderer Dank gilt dabei Herrn Sören Petzke sowie Frau Gesche Dallmeyer.